

Vergleichende Untersuchungen
zur genetischen Aktivität
ausgewählter Cumarinderivate

von

Gu~~drun~~ Abel

aus

Weißenburg i. Bay.

1980

1981 # 56



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546211_0033

Vergleichende Untersuchungen
zur genetischen Aktivität
ausgewählter Cumarinderivate

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt
von
Gudrun Abel
aus
Weißenburg i. Bay.

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.1980

Vorsitzender der Promotionskommission: Prof. Dr. H. Wegener

Erstberichterstatter:

Prof. Dr. C. G. Arnold

Zweitberichterstatter:

Prof. Dr. E. Kessler

Drittberichterstatter:

Prof. Dr. E. Gebhart

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Untersuchungen zur mutagenen und toxischen Wirkung der Cumarinderivate am Algensystem Chlamydomonas	7
2.1. Chlamydomonas als Testorganismus	7
2.1.1. Testobjekt und Testsystem	7
2.1.2. Ausgangssituation und Problemstellung	8
2.2. Material und Methoden	9
2.2.1. Medien und Kulturbedingungen	9
2.2.2. Testsubstanzen und Applikation	11
2.2.3. Verwendete Leuchtstoffröhren	12
2.2.4. Versuchsaufbau und -durchführung	12
2.2.5. Wachstum und Auswertung	14
2.3. Versuche und Ergebnisse	16
2.3.1. Einfluß der Bestrahlungsdauer	16
2.3.2. Einfluß der Bestrahlungsstärke	26
2.3.3. Einfluß der Substanzkonzentration	33
2.3.4. Einfluß einer Vorkultur im Dunkel	41
2.4. Diskussion der Ergebnisse im Algentestsystem	47
2.4.1. Reaktionen der Furocumarine mit der DNA	47
2.4.2. Mutagene Wirkung der Cumarinderivate	50
2.4.3. Toxische Wirkung der Cumarinderivate	59

	Seite
3. Untersuchungen zur Wirkung der Cumarinderivate auf Chromosomen an menschlichen Lymphocyten	62
3.1. Menschliche Lymphocytenkulturen als Testsystem	62
3.1.1. Testobjekt und verwendete Methoden	62
3.1.2. Ausgangssituation und Problemstellung	66
3.2. Material und Methoden	68
3.2.1. Kulturansatz und Präparation	68
3.2.2. Färbungen	69
3.2.2.1. Fluoreszenz plus Giemsa-Färbung	69
3.2.2.2. Orcein-Eisessig-Färbung	70
3.2.3. Testsubstanzen und Applikation	70
3.2.4. Verwendete Leuchtstoffröhren	71
3.2.5. Versuchsdurchführung	71
3.2.6. Cytogenetische Auswertung	72
3.3. Versuche und Ergebnisse	75
3.3.1. Wirkung der Cumarinderivate im Dunkel	75
3.3.1.1. Vorversuche zur Wachstumsgeschwindigkeit der Lymphocyten	75
3.3.1.2. Einfluß der Cumarinderivate auf die Rate der Schwesterchromatidaustausche	78
3.3.1.3. Einfluß der linearen Furocumarinderivate auf Chromosomenaberrationen	81
3.3.2. Wirkung der Cumarinderivate in Verbindung mit NUV	84
3.4. Diskussion der Ergebnisse im Lymphocytensystem	94
3.4.1. Dunkelversuche mit den Cumarinderivaten	94
3.4.2. Wirkung der Cumarinderivate in Verbindung mit NUV	98

Abkürzungen

Arg ⁺	= arginin-prototroph
arg ⁻	= arginin-auxotroph
B	= Bruch
DNA	= Desoxyribonukleinsäure
G	= Gap
M	= Minimalmedium
M1	= erste Metaphase
M2	= zweite Metaphase
M3	= dritte Metaphase
NUV	= UVA-Bereich, langwelliges UV (320-400 nm)
SCE	= Schwesterchromatidaustausch
8-MOP	= 8-Methoxypsoralen, Xanthotoxin
8-IOP	= 8-Isoamylenoxypsoralen, Imperatorin
5'-MA	= 5'-Methylangelicin
5,7-DMC	= 5,7-Dimethoxycumarin

1. Einleitung

Den Furocumarinen kommt aufgrund ihrer Verwendung als Arzneimittel im Rahmen der Photochemotherapie bei Psoriasis, Vitiligo, Mycosis fungoides und anderen Hautkrankheiten eine ständig wachsende Bedeutung zu. Bereits vor mehr als zweitausend Jahren nutzten die Ägypter die Eigenschaft vieler Furocumarine, bei Belichtung photosensibilisierend auf die Haut zu wirken. Die Kombination von furocumarinhaltigen Pflanzen oder Pflanzenteilen und Sonnenlicht wurde in diesen Breiten als erfolgreiches Mittel der Volksmedizin zur Heilung von Pigmentanomalien geschätzt. Für die klassische Medizin entdeckt wurde dieses wirksame Prinzip aus einer chemischen Substanz und der an sich für die Medizin wenig bedeutsamen Strahlung aus dem langwelligen UV-Bereich 1947 von dem ägyptischen Arzt El Mofty. Es sollte allerdings noch weitere 25 Jahre dauern, bis man die volle Bedeutung dieser Therapieform erkannte; von namhaften Dermatologen wird dies als die wichtigste Entdeckung für die Dermatotherapie seit Einführung des Cortisons angesehen (Weber, 1978).

Seit 1974 wird diese sog. Photochemotherapie, bestehend aus NUV-Bestrahlung und Applikation eines Furocumarins, meist 8-Methoxypsoralen (8-MOP), mit ausgezeichnetem Erfolg vor allem zur Behandlung der Schuppenflechte eingesetzt, für die bis dahin kein Mittel auch nur eine annähernd befriedigende Heilung brachte. Gerade dieser außerordentliche positive therapeutische Effekt der Photochemotherapie birgt die Gefahr einer unreflektierten Anwendung in sich. In den letzten Jahren gibt es jedoch eine Reihe von Hinweisen, daß diese Behandlung nicht ganz unbedenklich ist. Die oft recht schwierige Beurteilung, unter welchen Umständen der Einsatz eines Arzneimittels gerechtfertigt ist, setzt ein vernünftiges Ab-

wägen von therapeutischem Nutzen zu schädlichen Nebenwirkungen voraus.

Langzeitnebenwirkungen, die in der Regel als relativ schwer erfassbar anzusehen sind, lassen sich beispielsweise durch das Auftreten von mutagenen Veränderungen nachweisen. Die Untersuchung von Testsubstanzen auf die Induktion von mutagenen Schäden wird in der Regel an Somazellen durchgeführt. Dies ist vertretbar, da bei einer Schädigung der Somazellen davon ausgegangen werden muß, daß auch die Keimzellen mit hoher Wahrscheinlichkeit betroffen werden, sofern die Substanz dort in die Zellen gelangt. Die praktische Mutationsforschung an Somazellen hat zudem sehr an Bedeutung gewonnen, seit der enge Zusammenhang von Mutagenität und Cancerogenität bekannt ist. Nahezu alle bisher geprüften Cancerogene wirken mutagen, umgekehrt wirkt ein Großteil der Mutagene cancerogen. Bei Anwendung der Photochemotherapie ist daher bei hoher Mutagenität das Risiko eines induzierten Hautkrebses zu berücksichtigen; das Auftreten von Organkrebsen kann ebenfalls nicht völlig ausgeschlossen werden.

Mutationen können sich auf verschiedenen Ebenen manifestieren: Genmutationen umfassen das Spektrum von kleinsten molekularen Veränderungen bis hin zu submikroskopischen Strukturveränderungen der DNA-Sequenzen; Chromosomenmutationen betreffen strukturelle Veränderungen der Chromosomen etwa in Form von Chromosomenbrüchen; Genommutationen sind charakterisiert durch eine Änderung der Chromosomenzahl.

In der praktischen Mutationsprüfung werden in der Regel alle Mutationstypen berücksichtigt. Dafür stehen entsprechende Testsysteme zur Verfügung, deren Spektrum von bakteriellen Systemen, die speziell für den Nachweis von Genmutationen eingesetzt werden, bis hin zu Säugerzellen reicht. Ein ideales Testsystem, das sämtlichen Ansprüchen von der Praktika-

bilität, dem Erfassen sämtlicher Mutationstypen bis hin zur direkten Übertragbarkeit auf den Menschen genügt, gibt es nicht. Daher ist die Mutationsforschung stets auf eine Batterie von Testsystemen angewiesen, von denen jedes seinen Beitrag zur Gesamtabeschätzung des genetischen Risikos eines Arzneimittels liefert. Die Ergebnisse der einzelnen Systeme unterliegen jedoch sicher verschiedener Gewichtung. Die größte Relevanz für den Menschen weisen unbestreitbar in vivo Versuche an Säugern auf. Eine Reihe von Fragestellungen sind jedoch nur mit niedrigeren Testorganismen oder in vitro Methoden lösbar, daher sollten auch diese Untersuchungen - trotz aller Problematik - angemessen bewertet werden.

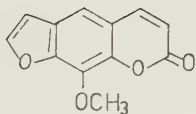
Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der vergleichenden Prüfung verschiedener Cumarinderivate auf ihre mutagene bzw. das genetische Material verändernde Wirkung. Die cytotoxische Wirkung sollte zudem in Bezug zur mutagenen Wirkung dieser Verbindungen gesetzt werden. Ein weiteres Anliegen ist im qualitativen Vergleich der mutationsauslösenden Aktivität der Verbindungen auf verschiedenen Ebenen zu sehen: einmal auf der Basis von molekularen Veränderungen der DNA und zum andern auf der Basis chromosomaler Schädigung. Aussagen über beide Typen von Mutationseignissen, die nicht parallel verlaufen müssen, tragen zur besseren Gesamteinschätzung des gesundheitlichen Risikos von Arzneimitteln wesentlich bei.

Als Modell für ein eukaryotisches System zur Erfassung von Genmutationen bot sich die von Schimmer 1974 eingeführte einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* an. Chromosomale Veränderungen können jedoch an *Chlamydomonas* nicht erfaßt werden. Daher wurden als zweites Testsystem menschliche Lymphocytenkulturen eingesetzt, anhand derer eine Untersuchung auf chromosomale Schäden möglich war.

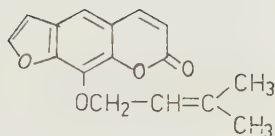
Mit diesen beiden Testsystemen wurden die drei Furocumarinderivate 8-Methoxypsoralen (8-MOP), 8-Isoamlylenoxypsoralen (8-IOP) und 5'-Methylangelicin (5'-MA) und das einfache Cumarin 5,7-Dimethoxycumarin (5,7-DMC) vergleichend geprüft. Die mutagene Wirkung von 8-MOP in Kombination mit NUV ist in verschiedenen Testsystemen beschrieben (Altenburg, 1956; Mathews, 1963; Igali und Gaszo, 1971; Averbeck, 1975; Schimmer, 1975; Carter et al, 1976). Wir betrachteten 8-MOP als Referenz, deren mutagene Potenz als Maß für die Einschätzung der anderen geprüften Verbindungen dienen sollte. Über 8-IOP, 5'-MA und 5,7-DMC liegen bisher keine quantitativen Aussagen bezüglich der mutagenen Wirkung in den verwendeten Testsystemen vor. Die Mutagenität von 8-IOP und 5'-MA ist an anderen Organismen bisher nicht untersucht.

Die Auswahl der Verbindungen erfolgte nach bestimmten Kriterien, die in Zusammenhang mit einer weiteren Problemstellung der Arbeit stehen: Im Rahmen dieser vergleichenden Untersuchungen sollte der Einfluß der Struktur der Derivate auf die erzielte Wirkung erfaßt werden. Bei den Furocumarinen lassen sich zwei Grundtypen unterscheiden: die linearen Derivate oder Psoralene und die angular gebauten Derivate mit der Grundform des Angelicins. Die linearen Derivate sind bei Belichtung mit NUV zur Mono- und Biadduktbildung mit der DNA fähig, also bifunktional, während die angularen Derivate als rein monofunktionale Verbindungen gelten.

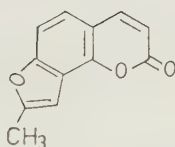
Als Vertreter der linearen Furocumarine wurden 8-MOP (Synonym: Xanthotoxin) und das ebenfalls in 8-Stellung substituierte 8-IOP (Synonym: Imperatorin) gewählt (Abb. 1); der Vergleich dieser beiden nahe verwandten Verbindungen sollte Aufschluß geben, inwieweit die photochemische Reaktion mit der DNA durch Veränderung des Substituenten in gleicher Position beeinflussbar ist und ob eine prinzipiell ähnliche Wirkungsweise beider Derivate erkennbar ist. Diesen linearen



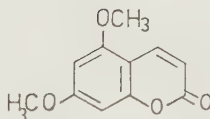
8-METHOXYPSORALEN
8-MOP



8-ISOAMYLENOXYPSORALEN
8-IOP



5'-METHYLANGELICIN
5'-MA



5,7-DIMETHOXYCUMARIN
5,7-DMC

Abb. 1: Strukturformeln der Cumarinderivate

(Die Nomenklatur entspricht nicht der IUPAC-Bezeichnung, sondern orientiert sich an der auf diesem Arbeitsgebiet allgemein üblichen Darstellungsweise)

und damit bifunktionalen Furocumarinen wurde eine monofunktionale Verbindung, das angular gebaute 5'-MA gegenübergestellt. Aus den Ergebnissen sollten sich Aussagen über die Beteiligung von Mono- bzw. Biaddukten an der mutagenen Wirkung ableiten lassen. 5,7-DMC wurde in die Untersuchungen miteinbezogen, da es nach Harter et al (1976) und nach Ou et al (1976) ähnlich den Furocumarinen mit der DNA reagieren soll. Diese Eigenschaft, die 5,7-DMC von allen anderen einfachen Cumarinen unterscheidet, wird der stereochemischen Ähnlichkeit mit 5-Methoxypsoralen zugeschrieben.

Dieser Fragenkomplex, der die quantitativen Aspekte der mutagenen und toxischen Wirkung der Derivate an sich sowie ihre Abhängigkeit von der Struktur umfaßt, wurde mit dem Algentestsystem angegangen. Die Untersuchungen sind als eine Art Vorscreening zu sehen, welches in diesem Maß nur für niedrigere Testsysteme möglich ist.

2. Untersuchungen zur mutagenen und toxischen Wirkung der Cumarinderivate am Algensystem Chlamydomonas

2.1. Chlamydomonas als Testorganismus

2.1.1. Testobjekt und Testsystem

In unserem Labor wird seit 1974 die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* als Testorganismus für Mutagenitätsuntersuchungen eingesetzt. Wie bei Bakterien können aus dem Spektrum der möglichen Mutationstypen jedoch nur bestimmte Genmutationen erfaßt werden. Verglichen mit Bakterien benötigt man für Experimente mit diesen Grünalgen wesentlich mehr Zeit, die Generationsdauer von *Chlamydomonas* beträgt etwa 12 h. Bei *Chlamydomonas* als eukaryotischem Organismus kann jedoch zusätzlich die Wirkung auf chromosomal organisierte DNA erfaßt werden. Möglicherweise können daher die Ergebnisse mit diesen Algen als aussagekräftiger für den Menschen angesehen werden als entsprechende mit den prokaryotischen Bakterien. Die Grünalgen sind autotrophe Organismen, bei denen dem Einfluß des Lichts eine große Bedeutung zukommt. Sie bieten sich daher gegenüber den heterotrophen Organismen besonders bei spezifischen Problemstellungen in Zusammenhang mit Licht an.

Aus dem Wildtyp *Chlamydomonas reinhardtii* (WT, Paarungstyp -, Stamm 137 c) wurden eine Reihe von Mutanten erhalten, die man für Mutagenitätsuntersuchungen heranziehen kann. Es hat sich gezeigt, daß für quantitative Studien eine spezifische argininabhängige Mutante besonders geeignet ist (Loppes, 1969).

Diese Mutante arg-1^- , Paarungstyp -, wurde uns von Dr. Loppes, Universität Lüttich, freundlicherweise überlassen; sie stammt aus dem Labor von Prof. R. P. Levine, der sie nach Bestrahlung des Wildtyps mit kurzwelligem UV erhielt. Ihre Argininbedürftigkeit ist kerncodiert. Der Genort liegt auf der Kopplungsgruppe I und bewirkt den Ausfall des Enzyms Acetyl-Glutamyl-Phosphat-Reduktase (Loppes et al, 1972).

Der Mutationsschritt $\text{arg}^- \longrightarrow \text{Arg}^+$ wurde als Indikator für eine Mutationsinduktion ausgewählt. Dieser Reversionsschritt erfolgt spontan relativ selten. Echte Rückmutanten sind bisher weder spontan noch nach Mutagenese gefunden worden; die Mehrzahl der auftretenden Arg^+ -Revertanten entsteht über Suppressormutationen (Loppes, 1969). Die relativ niedrige und zudem nahezu konstante Reversionshäufigkeit des Teststammes im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-7} bietet eine gute Grundlage für Mutageneseuntersuchungen. Hinzu kommt, daß sich diese arg-1^- -Mutante als sehr sensibel erwiesen hat: die Reversionsrate läßt sich durch Mutagene um den Faktor 10^3 und mehr steigern.

2.1.2. Ausgangssituation und Problemstellung

Über die mutagene Wirkung von Furocumarinen auf die arg-1^- -Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* liegen bereits grundlegende Untersuchungen vor (Schimmer, 1975; Schimmer und Hauber, 1977; Schimmer, 1978). Diese Arbeiten beziehen sich jedoch im wesentlichen auf das Furocumarin 8-MOP, welches für die Medizin zur Zeit die größte praktische Bedeutung besitzt. 8-MOP weist in Verbindung mit langwelligem UV die stärkste mutagene Wirkung auf, man findet jedoch auch in Kombination mit Blaulicht und Weißlicht eine signifikante

Erhöhung der Reversionsrate. Mutagenität im Dunkel konnte für 8-MOP mit dem verwendeten Teststamm nicht nachgewiesen werden (Schimmer und Hauber, 1977).

Die Cumarinderivate 8-IOP, 5'-MA und 5,7-DMC wurden bisher in Chlamydomonas nur qualitativ auf ihre mutagene Wirksamkeit geprüft; über die Mutagenität von 8-IOP und 5'-MA sind auch für andere Objekte keine Befunde veröffentlicht. 8-MOP als stark mutagene Verbindung in Chlamydomonas diene als Referenz, anhand derer die mutagene Potenz der anderen Derivate abgeschätzt werden sollte. Des weiteren sollte im System Chlamydomonas der Einfluß der Behandlungsbedingungen erfaßt werden. Aus dem Reaktionsverhalten der Testagenzien sollten sich Unterschiede zwischen linearen und angularen sowie einfachen Cumarinen erkennen lassen.

2.2. Material und Methoden

2.2.1. Medien und Kulturbedingungen

Minimalmedium nach Loppes (1972):

Lösung A	50 ml
Phosphatpuffer	50 ml
Spurenelementlösung	1 ml
Magnesiumsulfatlösung	1 ml
Aqua bidest.	900 ml

Lösung A:

NH_4Cl	8,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0 g

$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,0 g
Aqua bidest.	1000 ml

Phosphatpuffer:

KH_2PO_4	7,26 g
K_2HPO_4	14,34 g
Aqua bidest.	1000 ml

Spurenelementlösung:

EDTA	5,0 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,2 g
H_3BO_3	1,14 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,51 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,49 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,16 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,16 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,11 g
Aqua bidest.	100 ml

Magnesiumsulfatlösung:

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	24,6 g
Aqua bidest.	100 ml

Die Chemikalien wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, bezogen.

Anzuchtmedium: Zur Anzucht der arg-1^- Zellen wurde mit 50 μg Arginin $\cdot\text{HCl}$ /ml (Serva) supplementiert: M + Arg 50. Zur Bereitung der Festmedien wurden zusätzlich 15 % Agar (Bacto Difco) zugegeben.

Selektionsmedium: Die Selektion der Arg⁺-Revertanten und die Bestimmung der Überlebenden erfolgten auf Minimal-Agar (M-Agar), der zusätzlich 10 µg Arginin·HCl/ml enthielt: M + Arg 10 (Loppes, 1969).

Die Medien wurden durch 30minütiges Autoklavieren bei ca. 395 K und etwa 2 bar sterilisiert; Arginin·HCl wurde vor der Sterilisation zugegeben und mitautoklaviert.

Anzucht: Mit einer ausgeglühten Impföse wurde von einem etwa 5 Tage alten Klon auf Festmedium etwas abgenommen, in sterilem Anzuchtmedium suspendiert und in den Anzuchtkolben übergeimpft. Die Algen wurden im Lichtring (Philips Radium NL 32 W/32 C; etwa 20 000 Lux) bei Dauerlicht und kontinuierlicher Begasung mittels einer Aquariumpumpe bei etwa konstanter Temperatur von 298 K bis zu einer Zelldichte von 10⁵ bis 10⁶ Zellen/ml (Ende der logarithmischen Wachstumsphase) angezogen.

2.2.2. Testsubstanzen und Applikation

8-MOP wurde von der Firma Roth als "Xanthotoxin purissimum" bezogen, 8-IOP von der Firma Fluka und 5,7-DMC von EGA-Chemie. 5'-MA wurde von Dr. Mayr, Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg, synthetisiert.

Die Agenzien wurden steril abgewogen und direkt vor Gebrauch in 100 % Aceton p.a. gelöst. Die Stammlösungen wurden jeweils so angesetzt, daß maximal 1 % Aceton der Algensuspension zugesetzt wurde; unter diesen Bedingungen kann eine schädigende Wirkung des Lösungsmittels ausgeschlossen werden.

2.2.3. Verwendete Leuchtstoffröhren

Für die Mutationsversuche in Kombination mit NUV wurden Röhren der Firma Philips benutzt. Sie trugen die Bezeichnung TL 40 W/08 RS mit dem Emissionsmaximum bei $\lambda_{\max} = 366 \text{ nm}$ und einer Bandbreite HW von 40 nm.

Die Messung der Raumbestrahlungsstärke erfolgte nach Hartmann (1978). Bei begrenzter Apertur wurde eine Anschluß-eichung zwischen dem geeichten Thermosäulenmeßkreis mit konstanter Energieempfindlichkeit gegen den Raumbelichtungsmesser durchgeführt. Am Bestrahlungsort wurde grundsätzlich mit den Raumbelichtungsmesser gemessen. Die Raumbestrahlungsstärke betrug bei dem gewählten Abstand von 25 cm zwischen den NUV-Röhren und der Suspensionsoberfläche etwa $2 \text{ Wm}^{-2} \pm 10 \%$.

2.2.4. Versuchsaufbau und -durchführung

Alle Mutationsexperimente mit den Algen wurden mit zwei parallel angeordneten Leuchtstoffröhren im seitlichen Abstand von 22 cm durchgeführt. Dabei wurde jede Algensuspension in einer Glaspetrischale belichtet und während der Bestrahlung gut durchmischt (Magnetrührer), um eine gleichmäßige NUV-Bestrahlung der Zellsuspension zu gewährleisten.

Die Versuchsdurchführung erfolgte prinzipiell immer nach dem in Abb. 2 für einen Ansatz dargestellten Schema. Für jeden Ansatz einer Versuchsreihe wurden in der Regel 100 ml Algensuspension verwendet, alle Serien einer Versuchsreihe wurden möglichst parallel mit der gleichen Ausgangssuspension durchgeführt. Die Agenzien wurden jeweils gleichzei-

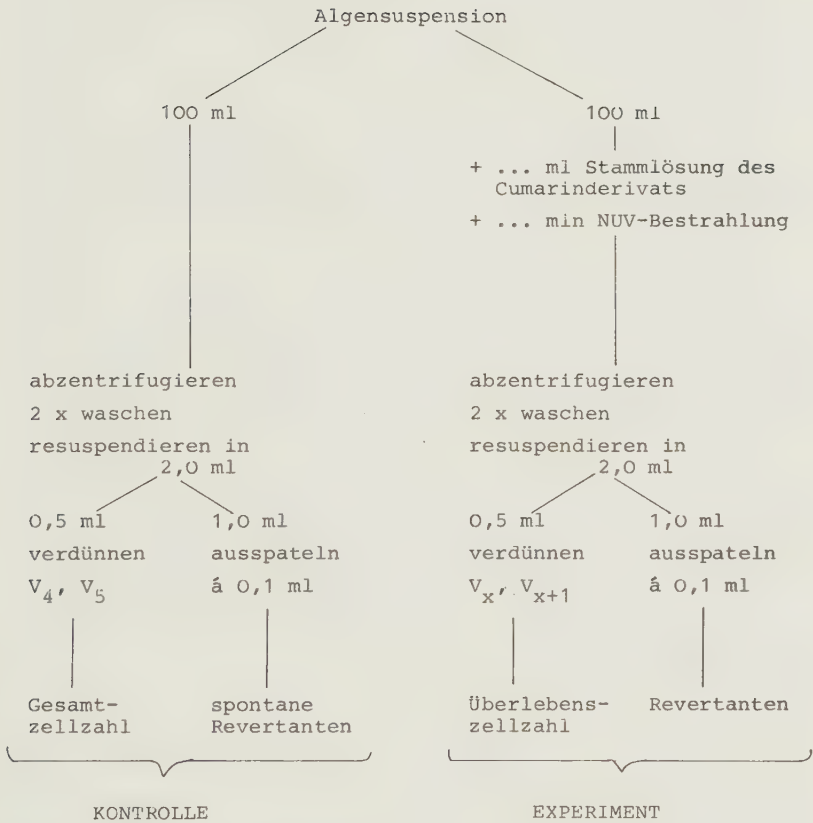


Abb. 2: Schema der Versuchsdurchführung, dargestellt an einem Ansatz.

tig innerhalb derselben Versuchsreihe getestet, da dieses Vorgehen die beste Ausgangsbasis für einen Vergleich der Substanzen bietet.

NUV-Bestrahlung allein übt innerhalb von 120 min bei dem gewählten Abstand keinen Einfluß auf die Überlebensrate und die Mutationsrate aus; daher wurde aus Gründen der Vereinfachung der umfangreichen Versuchsreihen auf eine Bestrahlung der Kontrolle verzichtet.

Die einzelnen Ansätze wurden nach der Behandlung 5 min bei 5 000 U/min abzentrifugiert; für das Waschen und Resuspendieren wurde Phosphatpuffer 1+2 (1 Teil Phosphatpuffer + 2 Teile Aqua bidest.) verwendet. Die Verdünnung zur Ermittlung der Gesamt- bzw. der Überlebenszellzahl erfolgte in Zehnerschritten bis zur geeigneten Verdünnungsstufe, d.h. bis zu einer erwarteten Koloniezahl von 50 bis 100 Kolonien pro Agar-Platte. In der Regel wurden zwei Verdünnungsstufen ausgespatelt, da die optimale Verdünnungsstufe nicht immer sicher abgeschätzt werden kann. Zur Ermittlung der Revertantenzahlen waren jeweils 10 Agar-Platten M + Arg 10 je Serie ausreichend.

2.2.5. Wachstum und Auswertung

Sobald die ausgestrichene Algensuspension auf den Agar-Platten angetrocknet war, wurden diese ins Dauerlicht gestellt (Weißlicht, etwa 5 000 Lux Beleuchtungsstärke; Klimaraum mit einer Temperatur von etwa 298 K).

Die Toxizität wurde als Inaktivierung der Zellen gemessen. Inaktivierte Zellen sind nicht mehr in der Lage, Kolonien

zu bilden bzw. sterben auf dem Stadium von Mikrokolonien ab. Eine Unterscheidung zwischen letal geschädigten und koloniebildungsunfähigen Zellen kann nicht getroffen werden. Bei den sog. "Überlebenden" handelt es sich also um Zellen, die zur Koloniebildung fähig sind. Die Zahl der Überlebenden ergibt sich somit als Differenz der Ausgangszellzahl oder Gesamtzellzahl abzüglich der inaktivierten Zellen. Die Auswertung der Gesamtzellzahl und der Überlebenszellzahl konnte nach 7 bis 10 Tagen vorgenommen werden.

Der als Gesamtzellzahl oder Ausgangszellzahl bezeichnete Wert wurde als Richtwert definiert und auf 100 % festgesetzt. Die Inaktivierungsrate, als Maß für die Toxizität, kann somit prozentual bezogen auf die Ausgangszellzahl dargestellt werden.

Die Mutagenität wurde gemessen an der Zahl der auftretenden Arg⁺-Revertanten; diese konnte nach 15 bis 20 Tagen bestimmt werden. Die induzierte Revertantenzahl berechnet sich als Differenz der beim Experiment erhaltenen Revertanten abzüglich der spontan in der Kontrollserie auftretenden.

2.3. Versuche und Ergebnisse

2.3.1. Einfluß der Bestrahlungsdauer

Bei einer äquimolaren Konzentration von 0,1 mM/l und konstanter Raumbestrahlungsstärke von 2 Wm^{-2} wurden die vier Cumarinderivate 8-MOP, 8-IOP, 5'-MA und 5,7-DMC auf ihre mutagene Aktivität getestet. Es wurde versucht, für jede einzelne Verbindung den Bestrahlungszeitraum zu erfassen, für den eine NUV-dosisabhängige Wirkung erkennbar war.

Für jede Substanz stammen die Werte für die verschiedenen Bestrahlungszeiten aus jeweils einer Versuchsreihe, bei der von derselben Algensuspension ausgegangen wurde. Dabei wurden die einzelnen Ansätze möglichst parallel verarbeitet. Ausnahme: Die Kurzzeitversuche mit 5,7-DMC (10, 20, 30 min) wurden unabhängig von den Langzeitversuchen (60, 90, 120 min) durchgeführt. Alle Versuchsreihen wurden zwei- bis dreimal durchgezogen.

Bei 8-MOP und 5'-MA erwies sich die hohe Toxizität als begrenzender Faktor: Eine Auswertung der Revertanten konnte nur bis zu einer Bestrahlungszeit von 30 min erfolgen. Der Zeitraum von 15 bis 30 min Bestrahlung wurde in 5-min-Intervallen erfaßt. Ein anderes Verhalten zeigte 8-IOP: Hier konnte bis zu 120 min bestrahlt werden, ohne daß Aussagen über die Revertantenzahl beeinträchtigt waren. Für 5,7-DMC wurde als längste Bestrahlungszeit ebenfalls 120 min festgelegt.

Die verwendete Methode erlaubt es, gleichzeitig mit der Ermittlung der Reversionsrate auch die inaktivierende Wirkung der Testagenzien zu erfassen. Die Inaktivierungskurven, als Maß für die Toxizität, sind in Abb. 3 dargestellt. Sie ergeben sich als Mittelwerte aus jeweils zwei Versuchen.

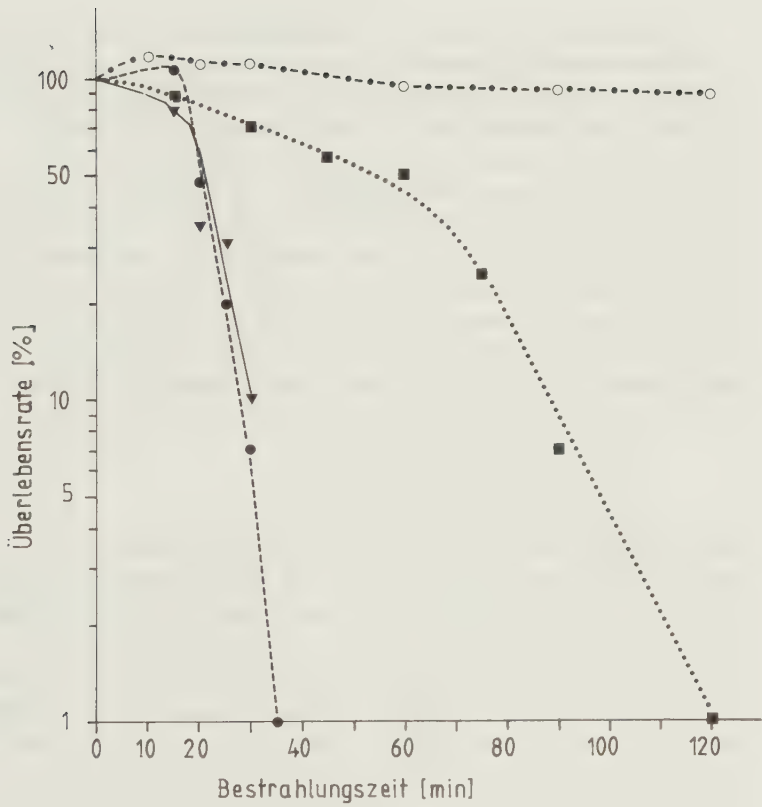


Abb. 3: Phototoxische Wirkung der Cumarinderivate auf die $arg-1^-$ -Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit.
 Konzentration: 0,1 mM/l, Raumbestrahlungsstärke: 2 Wm^{-2}
 ▼—▼ 8-MOP, ■.....■ 8-IOP, ●-----● 5'-MA, O- - - - O 5,7-DMC

Trägt man den Logarithmus eines quantitativ angebbaren Strahleneffekts wie der Überlebensrate über der Dosis auf, so können sich vier verschiedene typische Kurvenformen ergeben: eine exponentielle "Ein-Treffer-Kurve", eine Schulterkurve, eine zweiphasige Dosis-Effekt-Kurve oder eine "Stimulationskurve" (Niemann, 1978). Die mit den Furocumarinen + NUV erhaltenen Kurven entsprechen offensichtlich dem Typ der Schulterkurve. Diese Kurvenform läßt sich nach der Treffertheorie so deuten, daß im Organismus entweder mehrere Treffbereiche getroffen werden müssen, um den beobachteten Strahleneffekt zu erreichen, oder daß dazu in einem Treffbereich mehrere Treffereignisse stattfinden müssen.

5'-MA erweist sich innerhalb desselben Bestrahlungszeitraumes als etwa gleich toxisch wie das als Standard verwendete 8-MOP. Bis zu einer Bestrahlungszeit von 20 min ($= 2,4 \text{ kJm}^{-2}$) sind in jedem Versuch mehr koloniebildungsfähige Zellen nach Behandlung mit 5'-MA vorhanden als mit 8-MOP. Zwischen 20 und 25 min Bestrahlungszeit wird jedoch ein sehr steiler Abfall der Koloniezahl durch 5'-MA hervorgerufen, so daß die Überlebensrate letztlich sogar unter die der 8-MOP Serie sinkt.

Die Inaktivierungskurve nach 8-IOP-Behandlung verläuft bedeutend flacher. Nach 120 min NUV-Bestrahlung zeigt allerdings auch 8-IOP eine hohe Toxizität: Die Überlebensrate sinkt auf 1 %.

Als einzige der geprüften Verbindungen übt 5,7-DMC, das einfache Cumarin, kaum einen Einfluß auf die Überlebensrate unter den gegebenen Bedingungen aus. Selbst nach 120-minütiger NUV-Bestrahlung ($= 14,4 \text{ kJm}^{-2}$) ist noch keine

Abnahme der Überlebenszellzahl erkennbar. Im günstigsten Fall läßt nur eine sehr stark verlängerte Bestrahlungszeit eine toxische Wirkung von 5,7-DMC erwarten. Dies zu prüfen wurde nicht für sinnvoll gehalten, da zum einen eine synergistische Wirkung des NUV bei Verwendung hoher Dosen nicht erfaßt werden kann, und zum andern zu große Unterschiede in den Behandlungsbedingungen den Rahmen einer vergleichenden Untersuchung sprengen würden.

Um die Güte der erhaltenen Werte einschätzen zu können, wurde jeweils der mittlere Fehler der Ereignishäufigkeit berechnet. Er liegt für alle in Abb. 3 dargestellten Meßpunkte zwischen 0 und 3 % (Vertrauensbereich 68 %). Als Beispiel sei das Fehlernomogramm für 8-MOP und 5'-MA angeführt:

Mittlerer Fehler der Ereignishäufigkeit

Bestrahlungszeit	$\sigma(\%)$	
	8-MOP	5'-MA
15 min	3	0
20 min	3	3
25 min	3	2
30 min	2	1

Für alle im Ergebnisteil folgenden Inaktivierungskurven liegt der mittlere Fehler für die Meßwerte im Bereich zwischen 1 und 4 %.

Ein Vergleich der Toxizität anhand der jeweiligen Inaktivierungskurven kann die Ergebnisse verdeutlichen. Um 90 % der Zellen zu inaktivieren, benötigt man für

5'-MA	28 min
8-MOP	30 min
8-IOP	86 min
5,7-DMC	>120 min.

Die Toxizität des angularen 5'-MA erweist sich als mindestens ebenso stark wie die des linearen 8-MOP. 8-IOP als ebenfalls linear gebautes Derivat reagiert wesentlich langsamer als 8-MOP. Absolut gesehen ergeben sich jedoch auch durch 8-IOP nach entsprechend verlängerter Bestrahlungszeit vergleichbare Inaktivierungsraten.

Die Ergebnisse zur mutagenen Wirksamkeit der Verbindungen sind in Abb. 4 dargestellt; die Zahl der induzierten Revertanten ist jeweils gegen die Bestrahlungszeit aufgetragen. 8-MOP weist die steilste Kurve auf, d.h. in der relativ kürzesten Zeit kann 8-MOP eine hohe Zahl von Revertanten induzieren. Absolut gesehen liegen die Höchstwerte der unter diesen Bedingungen induzierten Revertanten im Bereich von 1 000 bis 1 500 bezogen auf 10^8 Überlebende. Diese Werte entsprechen Bestrahlungszeiten von 20 bis 30 min.

8-IOP reagiert langsamer, eine Abhängigkeit der mutagenen Wirkung von der Bestrahlungszeit ist klar erkennbar. Die flachere Kurve endet wie bei 8-MOP ebenfalls im Bereich von 1 000 bis 1 500 induzierten Revertanten/ 10^8 Überlebende; allerdings ist bei Behandlung mit 8-IOP etwa die dreifache Bestrahlungszeit zum Erreichen dieser Revertantenzahl nötig.

Bei 5'-MA wurde als Maximalwert 130 induzierte Revertanten/ 10^8 Überlebende erhalten. Die mutagene Potenz von 5'-MA ist auf jeden Fall bedeutend schwächer als die der bifunktionalen linearen Verbindungen, da sowohl durch 8-MOP als auch durch 8-IOP eine für die Auswertung genügend hohe Zahl an Revertanten induziert wird bei gleichen Überlebensraten (siehe Abb. 5).

5,7-DMC bewirkt eine äußerst schwache Revertantenerhöhung, die zudem nicht in jedem Versuch reproduzierbar ist. Eine

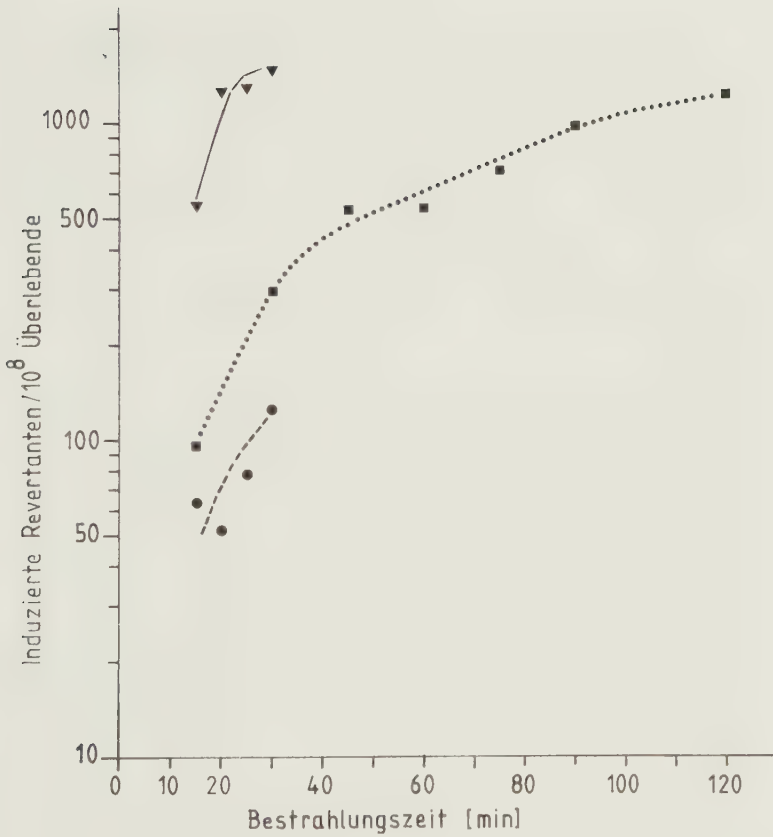


Abb. 4: Mutagene Wirkung der Cumarinderivate auf die $arg-1^-$ -Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit.
 Konzentration: 0,1 mM/l, Raumbestrahlungsstärke: 2 Wm^{-2}
 ▼—▼ 8-MOP, ■.....■ 8-IOP, ●---● 5'-MA,
 (Mittelwerte aus 2 Versuchen)

Dosisabhängigkeit ist nicht erkennbar, da der Effekt, falls vorhanden, zu gering ausfällt. Dies ist gut ersichtlich aus dem jeweiligen Faktor der Revertantenerhöhung gegenüber der Kontrolle (Tab. 1). Da 5,7-DMC im Licht dimerisiert (Shim et al, 1978) und damit für die Photoreaktion mit der DNA nicht mehr oder in geringerem Maß zur Verfügung steht, erschien es sinnvoll, auch kurze Bestrahlungszeiten zu prüfen. Weder kurze noch lange Bestrahlungszeiten erwiesen sich jedoch als effektiv zur Revertanteninduktion durch 5,7-DMC (Tab. 1).

Zur besseren Beurteilung der erhaltenen Kurven wurde der mittlere Fehler der experimentell bestimmten Reversionsraten berechnet. Da auch die experimentell erhaltene jeweilige Überlebensrate, die ebenfalls mit einem mittleren Fehler behaftet ist, in die Berechnung mit eingeht, mußte mit der Gaußschen Fehlerfortpflanzung gearbeitet werden (Quotientenregel). Auf dem 68 % Vertrauensbereich ergeben sich in etwa Fehlerwerte zwischen 10 und 20 %, je nach Anzahl der Revertanten und Überlebenden. Dieser Fehlerbereich gilt im allgemeinen auch für alle im folgenden dargestellten Versuche (Ausnahmen bilden die Versuche mit einer sehr geringen Anzahl an Revertanten; auf diese ist im Text hingewiesen).

Die experimentell erhaltenen Verteilungen auf den Agar-Platten wurden mit dem F-Test (Varianzenvergleich) geprüft. Sowohl bezüglich der Überlebenden als auch bezüglich der Revertanten stimmen die experimentell erhaltenen Verteilungen gut mit den theoretisch zu erwartenden überein.

Bestrahlungszeit (min)	Induzierte Revertanten/ 10 ⁸ Überlebende				Faktor der Revertanten- erhöhung			
	10	20	30		10	20	30	
Experiment 1	0	0	2		1	1	1,3	
Experiment 2	1	0	2		1,2	1	1,3	
Experiment 3	0	0	0		1	0,5	1	
Bestrahlungszeit (min)	60	90	120		60	90	120	
Experiment 1	4	8	1		2,3	3,7	1,3	
Experiment 2	0	1	2		1	1,1	1,2	
Experiment 3	9	5	5		4	2,7	2,7	

Tab. 1: Einfluß von 5,7-DMC + NUV auf die Induktion von Arg⁺-Revertanten von Chlamydomonas reinhardtii in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit.
(Konzentration: 0,1 mM/l; Raumbestrahlungsstärke: 2 Wm⁻²)

Vergleicht man die Fähigkeit der einzelnen Cumarinderivate bezüglich der Revertanteninduktion bei einer Bestrahlungszeit von 30 min ($= 3,6 \text{ kJm}^{-2}$), so ergibt sich folgende Reihenfolge:

8-MOP	1469	Revertanten/ 10^8	Überlebende
8-IOP	297	"	/ 10^8 "
5'-MA	124	"	/ 10^8 "
5,7-DMC	3	"	/ 10^8 "

Auch aus dieser Darstellung geht hervor, daß die Mutagenität der bifunktionalen Furocumarine 8-MOP und 8-IOP wesentlich stärker ist als die der monofunktionalen Verbindungen 5'-MA und 5,7-DMC.

Vergleicht man die genetische Effektivität von verschiedenen Verbindungen, so muß auch der Zusammenhang zwischen Zellinaktivierung und dem induzierten genetischen Ereignis berücksichtigt werden (Auerbach, 1976). Daher wurde die induzierte Reversionsrate als Funktion der Überlebenden betrachtet (Abb. 5).

Auch aus dieser Sicht zeigt sich, daß die linearen Verbindungen eine höhere Wirksamkeit aufweisen als das angulare Derivat 5'-MA. Bei 50 % Überlebenden erreichen die induzierten Revertantenzahlen/ 10^8 Überlebende etwa folgende Werte:

8-MOP	890
8-IOP	550
5'-MA	60

Auch bei 10 % Überlebenden ändert sich weder die Reihenfolge noch das Verhältnis:

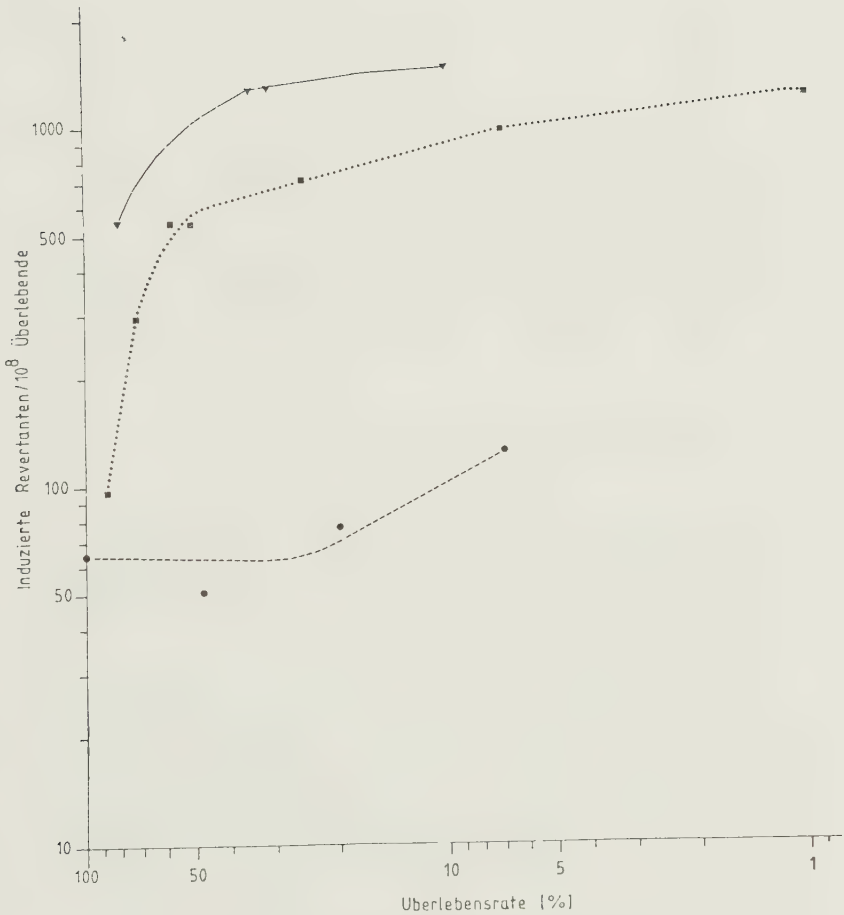


Abb. 5: Mutagene Wirkung der Furocoumarinderivate auf die *arg-1⁻*-Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* bei verschiedenen Bestrahlungszeiten, dargestellt als Funktion der Überlebenden.
 Konzentration: 0,1 mM/l, Raumbestrahlungsstärke: 2 Wm⁻²
 ▼—▼ 8-MOP, ■.....■ 8-IOP, ●-----● 5'-MA

8-MOP	1470
8-IOP	900
5'-MA	105.

Bei beiden verglichenen Überlebensraten liegt die Reversionsrate der linearen Verbindungen um den Faktor 10-15 höher als die von 5'-MA. Deutlich wird mit dieser Betrachtungsweise, daß sich die mutagene Potenz von 8-MOP und 8-IOP unter Berücksichtigung der Überlebensrate weniger stark unterscheidet als auf der Basis der Behandlungsdauer.

2.3.2. Einfluß der Bestrahlungsstärke

Nachdem 5,7-DMC in den vorangegangenen Versuchen keine eindeutige mutagene Wirksamkeit gezeigt hatte, wurde diese Verbindung in die folgenden Experimente nicht mehr miteinbezogen.

Die Algensuspensionen (je 100 ml) wurden mit 5 µg/ml der jeweiligen Testsubstanz behandelt und sofort anschließend für 75 min bestrahlt. Die Raumbestrahlungsstärke wurde mit Hilfe von entsprechend konstruierten Lochblenden aus schwarzem Karton derart verändert, daß nur die Hälfte bzw. ein Viertel der ursprünglichen NUV-Oberflächendosis die Schalen erreichte. Dies brachte eine Veränderung der NUV-Dosis bei konstanter Bestrahlungszeit, das bedeutet ein Ausschalten einer eventuellen Zeitabhängigkeit.

Alle drei Testagenzien wurden jeweils in derselben Versuchsreihe parallel geprüft, so daß identische Versuchsbedingungen gewährleistet waren. Durch dieses Vorgehen konnte ein Nachlassen der NUV-Röhren (durch Verschleiß bedingt) beim Vergleich der Substanzen vernachlässigt werden. Es wur-

den insgesamt vier Versuchsreihen durchgeführt.

8-MOP und 5'-MA zeigen unter diesen Bedingungen vergleichbar starke Wirkung auf die Überlebensrate. Eine geringe NUV-Dosis wirkt sich auf die Zahl der Überlebenden der mit 5'-MA behandelten Algen weniger stark aus als auf die mit 8-MOP behandelten Zellen; bei starker NUV-Dosis fällt der Überlebenswert der 5'-MA Serie bis auf 2 % ab. Die dosisabhängige Abnahme der Überlebensrate ist in jedem Versuch gegeben. 8-IOP zeigt eine wesentlich geringere Phototoxizität: Selbst bei der stärksten NUV-Dosis von 9 kJm^{-2} wurden noch über 40 % Überlebende ermittelt (Abb. 6).

Die Ergebnisse bezüglich der mutagenen Wirksamkeit der Furocumarinderivate sind für 8-MOP und 8-IOP in Abb. 7 dargestellt. Bei Experiment 2 konnte für 8-MOP die Zahl der Revertanten für die 9 kJm^{-2} nicht erfaßt werden, bei Experiment 1 ist der Wert von 3000 Revertanten/ 10^8 Überlebende rein rechnerisch ermittelt; eine Revertante mehr oder weniger hätte das Ergebnis bereits wesentlich verändert. Für die Bildung des Mittelwertes in Abb. 15 wurden daher nur die Experimente 3 und 4 benutzt.

Für 8-MOP zeigt sich ein starkes Anwachsen der Revertantenzahl bei Erhöhung der NUV-Dosis. Der Steigerungsfaktor der Reversionsrate liegt bei doppelter NUV-Dosis erheblich über dem Faktor von zwei.

Die Versuche mit 8-IOP weisen eine sehr gute Übereinstimmung der Einzelexperimente auf. Die dosisabhängige Erhöhung der Reversionsrate beträgt in jedem Versuch erheblich mehr als das zweifache bei doppelter NUV-Dosis.

Die Experimente mit 5'-MA liefern keine reproduzierbaren Werte. Die Resultate sind in Tab. 2 aufgeschlüsselt. Da

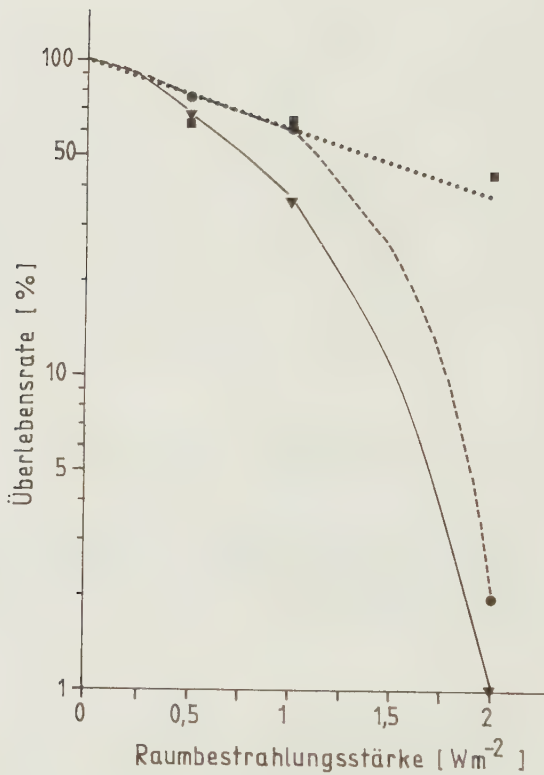


Abb. 6: Phototoxische Wirkung der Furocumarinderivate auf die arg-1^- -Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke.
Konzentration: $5 \mu\text{g/ml}$, Bestrahlungszeit: 75 min
▼—▼ 8-MOP, ■.....■ 8-IOP, ●----● 5'-MA
Die Kurvenpunkte ergeben sich als Mittelwerte aus 4 Versuchen.

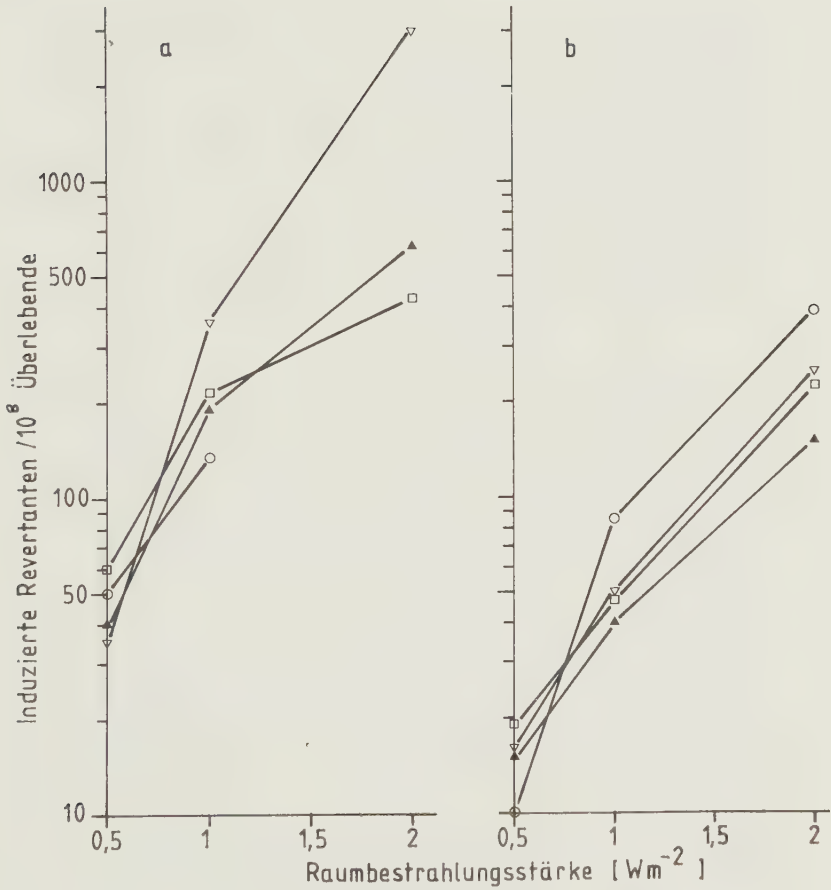


Abb. 7: Mutagene Wirkung der linearen Furocumarinderivate auf die *arg-1⁻*-Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke.

Konzentration: 5 µg/ml, Bestrahlungszeit: 75 min

▽ Experiment 1; ○ Experiment 2; □ Experiment 3;

▲ Experiment 4.

die Versuche unter genau denselben Bedingungen wie die bereits dargestellten mit 8-MOP und 8-IOP durchgeführt wurden, ist es wohl auszuschließen, daß die unterschiedlichen Ergebnisse durch verschiedene Versuchsbedingungen zustandekommen, wenn der Wirkungsmechanismus für 5'-MA der gleiche ist. Die dargestellten Werte lassen bezüglich der mutagenen Wirksamkeit keine dosisabhängige Induktion der Revertanten erkennen. Da diese Befunde keine klare Aussage möglich machen, wurde versucht, durch kürzere Bestrahlungszeiten - längere waren aufgrund der hohen Toxizität nicht möglich -, in einen dosisabhängigen Bereich zu gelangen.

Bei 45minütiger Bestrahlungszeit zeigt sich bei geringer und mittlerer Oberflächendosis von NUV ($0,5$ bzw. 1 Wm^{-2}) keine mutagene Wirkung von 5'-MA: trotz einer Überlebensrate von 80% ($0,5 \text{ Wm}^{-2}$) bzw. 105% (1 Wm^{-2}) treten keine induzierten Revertanten auf. Erst bei 2 Wm^{-2} Raumbestrahlungsstärke ergibt sich eine Revertanteninduktion von $22 \text{ Revertanten}/10^8 \text{ Überlebende}$ (Überlebensrate 34%).

Ähnlich sieht das Ergebnis bei 60minütiger Bestrahlungszeit aus (Tab. 2): nur jeweils 2 induzierte Revertanten bei $0,5 \text{ Wm}^{-2}$ (108% Überlebende) und 1 Wm^{-2} (88% Überlebende) und $20 \text{ induzierte Revertanten}/10^8 \text{ Überlebende}$ bei 2 Wm^{-2} (18% Überlebende). Ein etwa gleich hoher Wert an Revertanten wurde bei 1 Wm^{-2} und 75 min Bestrahlungszeit (Experiment 2, Tab. 2) induziert; diese Bedingungen entsprechen einer NUV-Dosis von etwa $4,5 \text{ kJm}^{-2}$. Bei 60 min Bestrahlungszeit und 2 Wm^{-2} ergibt sich dagegen ein Wert von $7,2 \text{ kJm}^{-2}$. Dies weist ebenso wie die Tatsache, daß nach 45 min und 60 min Bestrahlung mit NUV (unter sonst gleichen Bedingungen) gleich hohe Reversionsraten auftreten, darauf hin, daß bei Behandlung mit 5'-MA im auswertbaren Bereich keine klare NUV-Dosisabhängigkeit ersichtlich ist.

		Induzierte Revertanten/10 ⁸ überlebende		
Bestrahlungsstärke (Wm ⁻²)		0,5	1	2
Bestrahlungszeit (min)				
75	Experiment 1	14	15	8
	Experiment 2	0	21	★
	Experiment 3	6	2	★
	Experiment 4	0	3	★
60		2	2	20
45		0	0	22

Tab. 2: Wirkung von 5'-MA auf die Induktion von Arg⁺-Revertanten bei verschiedenen NUV-Dosen.

(Konzentration: 5 µg/ml)

★ nicht meßbar

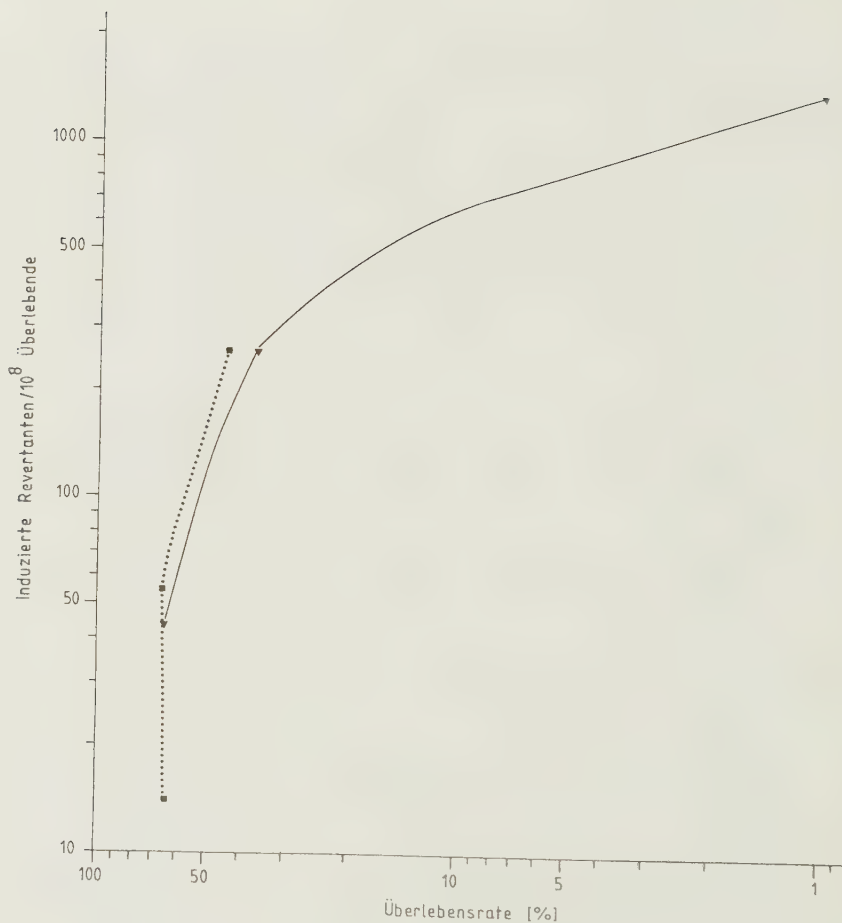


Abb. 8: Mutagene Wirkung der linearen Furocumarinderivate auf die $arg-1^-$ -Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* bei verschiedenen Bestrahlungsstärken, dargestellt als Funktion der Überlebenden.

Konzentration: 5 $\mu\text{g/ml}$, Bestrahlungszeit: 75 min

▼—▼ 8-MOP, ■.....■ 8-IOP

Die Abhängigkeit der induzierten Revertantenzahl von der Überlebensrate läßt sich für die beiden linearen Derivate 8-MOP und 8-IOP aus Abb. 8 entnehmen. Die Agenzien liefern im Bereich bis 40 % Überlebende vergleichbar hohe Mutationsraten. Verglichen mit den durch das angulare Furocumarinderivat 5'-MA induzierten Reversionsraten liegen die durch 8-MOP und 8-IOP erreichten Werte auch auf der Basis gleicher Überlebensraten, d.h. bei gleicher Toxizität, mindestens um das 5 bis 10fache höher.

2.3.3. Einfluß der Substanzkonzentration

Für die drei Furocumarinderivate wurden folgende Konzentrationen ausgetestet: 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml und 20 µg/ml. Die Versuche mit den drei Verbindungen wurden parallel in einer Versuchsreihe durchgeführt, wobei jeweils von derselben Algensuspension ausgegangen wurde. Je 100 ml Algensuspension wurden mit der entsprechenden Konzentration des Testagens versehen und sofort anschließend für 30 min bestrahlt (2 W m^{-2} ; Abstand der NUV-Röhren von der Suspensionsoberfläche: 25 cm). Es wurden drei Versuchsreihen durchgeführt.

Über die inaktivierende Wirkung der Testsubstanzen bei verschiedenen Substanzkonzentrationen gibt Abb. 9 Aufschluß. 8-MOP und 5'-MA weisen auch unter diesen Bedingungen vergleichbar starke Beeinflussung der Überlebensrate auf; bei geringen Konzentrationen wirkt 5'-MA zunächst weniger stark, durch den rapiden Abfall im Bereich zwischen 5 und 10 µg/ml wird die starke Phototoxizität von 5'-MA jedoch klar erkennbar. 8-IOP zeigt die schwächste inaktivierende Wirkung: Nach 30minütiger Bestrahlung mit einer Konzentration von 20 µg/ml beträgt die Überlebensrate noch immer über 60 %.

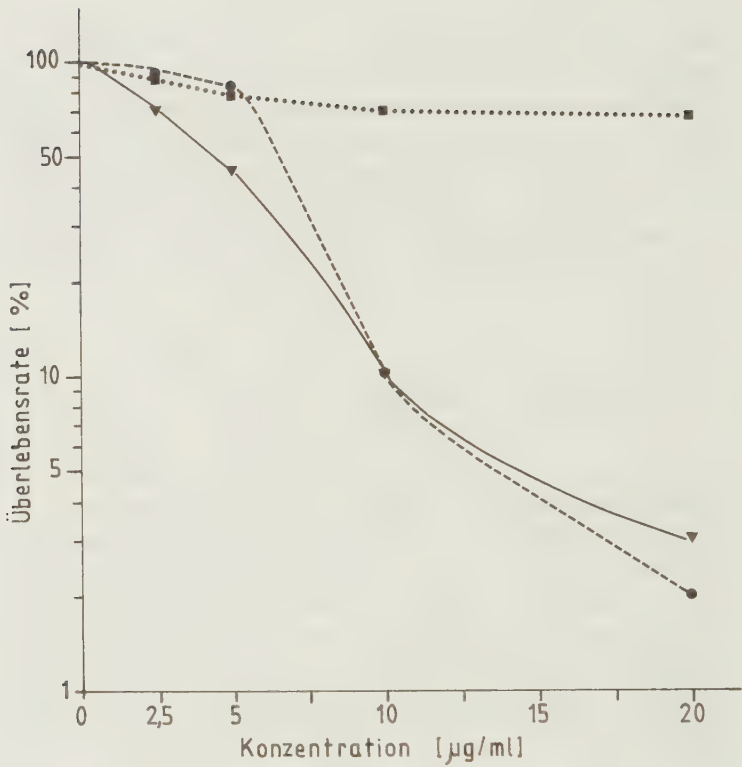


Abb. 9: Phototoxische Wirkung der Furocoumarinderivate auf die $arg-1^-$ -Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration.

Bestrahlungsbedingungen: 2 Wm^{-2} , 30 min

▼—▼ 8-MOP, ■.....■ 8-IOP, ●-----● 5'-MA

(Mittelwerte aus 3 Versuchen)

Die Ergebnisse zur mutagenen Aktivität der Furocumarine sind, aufgeschlüsselt nach Einzelexperimenten, in den Abb. 10-12 dargestellt.

8-MOP zeigt eindeutig eine dosisabhängige Wirkung: bis 10 µg/ml bewirkt eine Erhöhung der Substanzkonzentration um das doppelte eine entsprechende Steigerung der Revertantenzahl. Bei einer Konzentration von 20 µg/ml ist der Sättigungsbereich erreicht: der Anstieg wird wesentlich flacher bzw. die Kurve fällt in Einzelversuchen sogar wieder leicht ab. Dies kann sich dadurch ergeben, daß 30 min nicht ausreichen, um diese Substanzmenge quantitativ zur Reaktion zu bringen.

Die mit 8-IOP erhaltenen Kurven verlaufen prinzipiell ähnlich denen von 8-MOP: Der Anstieg der Revertantenzahl entspricht in etwa der Erhöhung der Substanzkonzentration. Bei diesem Derivat ist unter den gewählten Versuchsbedingungen eine Sättigung bei etwa 10 µg/ml erreicht.

Bei Behandlung der Algensuspensionen mit 5'-MA + NUV konnte jeweils der 20 µg/ml-Wert der Reversionsrate nicht ausgewertet werden: Bei nur 2 % Überlebenden (in jedem Versuch) reichte die mutagene Aktivität nicht aus, um Revertanten zu induzieren. Bei Experiment 2 gilt dasselbe bereits für die Behandlung mit 10 µg/ml. Hier liegen auch die Revertantenzahlen für die anderen Konzentrationen auffallend niedrig: Bei Überlebensraten von 88% bzw. 92 % konnte jeweils nur eine einzige Revertante erfaßt werden, die rein rechnerisch einen Wert von einer Revertante/ 10^8 Überlebende ergibt. Dieser Versuch erlaubt daher keinerlei Aussage. Da unter identischen Versuchsbedingungen Experiment 2 nach Behandlung mit 8-MOP und 8-IOP durchaus den anderen Versuchen vergleichbare Ergebnisse lieferte, ist die unregelmäßige Wirksamkeit von 5'-MA nicht erklärbar. Experiment 1

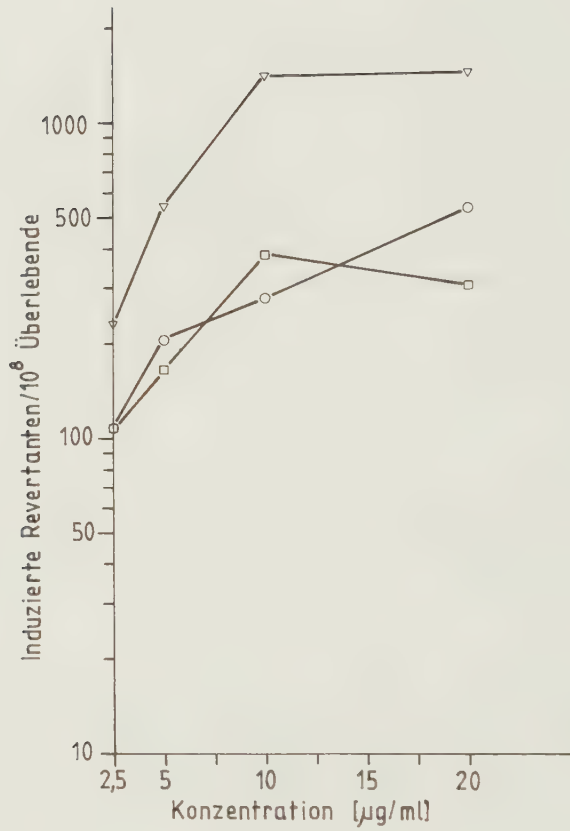


Abb. 10: Mutagene Wirkung von 8-MOP auf die $arg-1^-$ -Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration.

Bestrahlungsbedingungen: 2 Wm^{-2} , 30 min

▽ Experiment 1; ○ Experiment 2; □ Experiment 3.

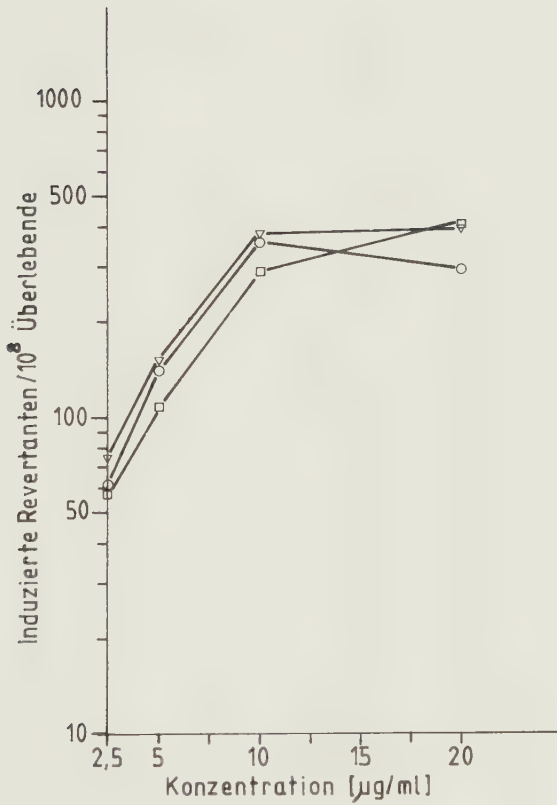


Abb. 11: Mutagene Wirkung von 8-IOP auf die $arg-1^-$ -Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration.

Bestrahlungsbedingungen: 2 Wm^{-2} , 30 min

▽ Experiment 1; ○ Experiment 2; □ Experiment 3.

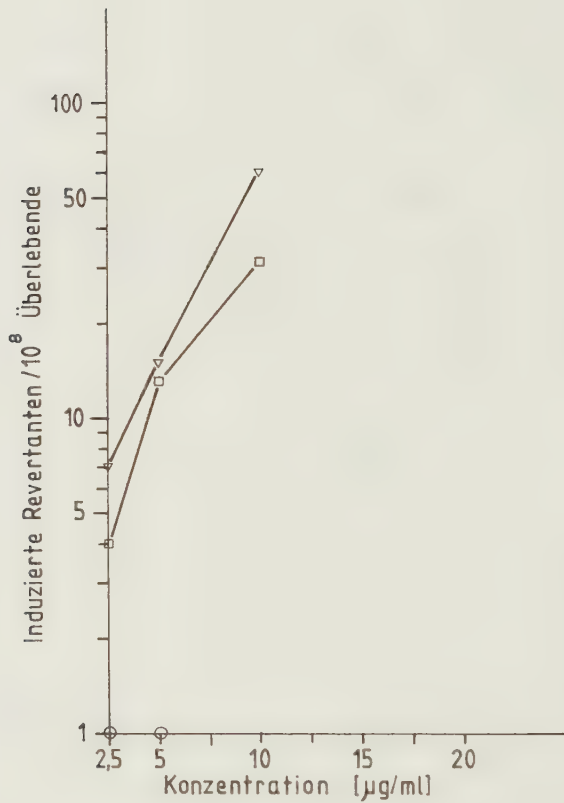


Abb. 12: Mutagene Wirkung von 5'-MA auf die *arg-1⁻*-Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Konzentration.

Bestrahlungsbedingungen: 2 Wm^{-2} , 30 min

Δ Experiment 1; ○ Experiment 2; □ Experiment 3.

		Induzierte Revertanten/10 ⁸ Überlebende			
Konzentration (µg/ml)		2,5	5	10	20
Bestrahlungszeit (min)					
30	Experiment 1	7	15	60	*
	Experiment 2	1	1	*	*
	Experiment 3	3	12	30	*
25		3	4	13	*
20		2	9	15	5

Tab. 3: Wirkung von 5'-MA + NUV auf die Reversionsrate von *Chlamydomonas reinhardtii* in Abhängigkeit von der Substanzkonzentration.
(Bestrahlungsbedingungen: 2 Wm^{-2} , 30 min)

* nicht meßbar

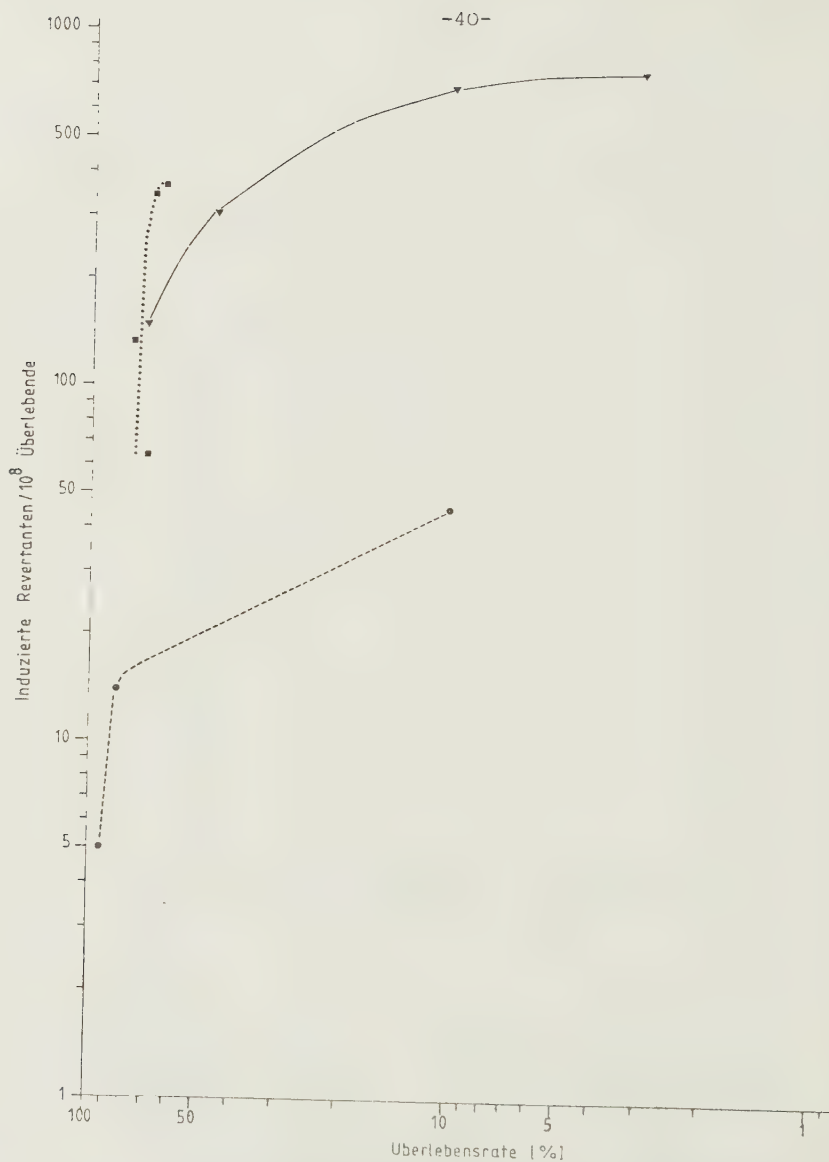


Abb. 13: Mutagene Wirkung der Furocumarinderivate auf die *arg-1*-Mutante von *Chlamydomonas reinhardtii* bei verschiedenen Substanzkonzentrationen, dargestellt als Funktion der Überlebenden.

Bestrahlungsbedingungen: 30 min, 2 Win^{-2}

▼—▼ 8-MOP, ■.....■ 8-IOP, ●-----● 5'-MA

und Experiment 3 ergeben ähnliche Kurven im auswertbaren Bereich: es erfolgt ein Anstieg der Revertantenzahl bei Erhöhung der Substanzkonzentration.

Mit 5'-MA wurden zusätzlich zwei weitere Experimente durchgeführt, in denen die Bestrahlungszeit auf 25 bzw. auf 20 min reduziert wurde. Auch unter diesen Bedingungen ließ sich die Reversionsrate für 20 µg/ml nicht ermitteln aufgrund des Fehlens von Revertanten. Eine eindeutige Dosisabhängigkeit läßt sich zwar bezüglich der Substanzkonzentration feststellen, sie fehlt jedoch in Bezug auf die NUV-Dosis (Tab. 3). Da beide Zusatzversuche parallel angesetzt wurden, ausgehend von derselben Algensuspension, sollte man nach 25minütiger Bestrahlung mit NUV eine höhere Reversionsrate erwarten. Dies bestätigt die unter 2.3.2. erhaltenen Ergebnisse, daß die NUV-Dosis wenig Einfluß auf die Revertanteninduktion durch 5'-MA ausübt.

Beim Vergleich der mutagenen Potenz der Furocumarinderivate in Abhängigkeit von der Überlebensrate tritt auch bei diesen Versuchen wieder der Unterschied zwischen den linearen Verbindungen und dem angular gebauten 5'-MA deutlich in Erscheinung: 8-IOP und 8-MOP bewirken bei entsprechenden Überlebensraten im Bereich von 70-80 % eine 5-10fach höhere Reversionsrate als 5'-MA.

2.3.4. Einfluß einer Vorkultur im Dunkel

Nach theoretischen Überlegungen von Rodighiero et al (1970) und Bordin et al (1979a) und nach experimentellen Erfahrungen von Schimmer (1978) müßten sich vorgeschaltete Dunkelperioden fördernd auf die toxische und mutagene Wirkung der Furocumarinderivate auswirken. In den folgenden Versuchen

sollte geprüft werden, ob die verschiedenen Cumarinverbindungen in ähnlicher Weise auf eine Vorkultur im Dunkel ansprechen würden.

Die Zellen wurden nach der Anzucht mit 5 µg/ml bzw. 50 µg/ml der Testsubstanzen versetzt und sofort ins Dunkel gestellt (Schüttler). Nach 30, 60 und 120 min Vorinkubation wurden die Suspensionen ohne Mediumwechsel sofort mit NUV bestrahlt (30 min, 2 Wm⁻²).

Die Vorkultur mit 5 µg/ml hat wenig Einfluß auf die Überlebensrate wie auf die Revertanteninduktion (2 Experimente, Tab. 4). Nur bei 8-MOP und 8-IOP kann nach 120minütiger Vorinkubation ein Absinken der Zellzahl registriert werden. Die Revertantenzahl steigt bei den mit 8-MOP behandelten Algen nach Vorkultur an, jedoch nicht kontinuierlich mit der Länge der Dunkelperiode. Dagegen findet man bei mit 8-IOP behandelten Kulturen in keinem Fall eine Erhöhung der Revertantenzahl durch Vorinkubation. Eine leichte Zunahme kann bei den 5'-MA Serien beobachtet werden. Die Anzahl der durch 5'-MA und 5,7-DMC induzierten Revertanten ist jedoch relativ gering. Deswegen wurden höhere Konzentrationen verwendet, um eine sichere Aussage machen zu können.

Die Vorkultur mit 50 µg/ml bringt wesentlich eindeutiger Ergebnisse (Abb. 14; Tab. 5). Die Inaktivierungskurven zeigen, daß die Vorkultur mit 8-MOP einen klaren Abfall der Überlebensrate bewirkt. Auf die Überlebensraten der mit 8-IOP und 5,7-DMC behandelten Zellen zeigt eine Vorinkubation im Dunkel wenig Einfluß. Völlig unerwartet das reproduzierbare Ergebnis mit 5'-MA: Durch die vorgeschalteten Dunkelperioden wird die toxische Wirkung der nachfolgenden Bestrahlung reduziert. Bei den in Abb. 14 dargestellten Inaktivierungskurven wurde der Überlebenswert der jeweili-

Vorkulturzeit (min)	Überlebensrate (%)				Induzierte Revertanten/ 10 ⁸ Überlebende			
	0	30	60	120	0	30	60	120
8-MOP	100	82	96	62	471	670	464	620
8-IOP	100	93	91	66	151	148	140	128
5'-MA	100	78	87	99	17	19	19	27
5,7-DMC	100	110	91	90	5	5	3	9

Tab. 4: Einfluß einer Vorkultur mit den Cumarinderivaten (5 µg/ml) im Dunkel auf die nachfolgende Photoreaktion (Bestrahlungsbedingungen: 2 Wm⁻², 30 min). Die Überlebensraten stellen Mittelwerte aus 2 Versuchen dar, die Reversionsrate ist als Zahl der induzierten Revertanten/10⁸ Überlebende aus 2 Versuchen angegeben. Der Überlebenswert der jeweiligen Serie ohne Vorkultur wurde auf 100 % gesetzt und als Bezugswert benutzt.

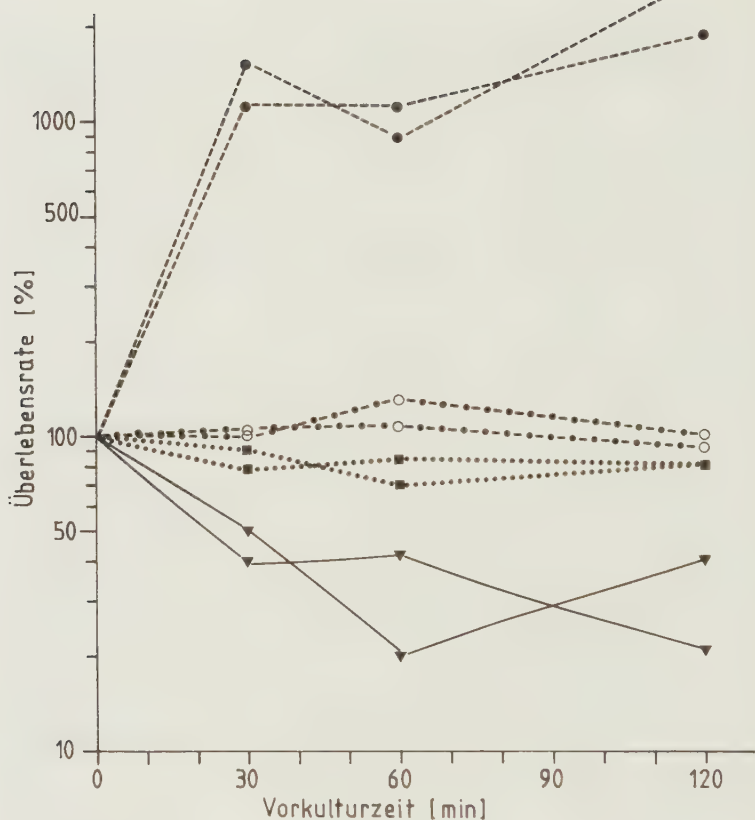


Abb. 14: Einfluß einer Vorkultur im Dunkel auf die Photo-
toxizität der Cumarinderivate.
Bestrahlungsbedingungen: 2 Wm^{-2} , 30 min; Konzentra-
tion: $50 \mu\text{g/ml}$
Der Überlebenswert der jeweiligen Serie ohne Vor-
kultur wurde auf 100 % gesetzt und als Bezugswert
für den Einfluß einer Vorkultur benutzt.
▼—▼8-MOP, ■.....■8-IOP, ●---●5'-MA, ○-.-○ 5,7-DMC
(Jeder Kurve entspricht 1 Experiment)

		Induzierte Revertanten/ 10^8 Überlebende			
Vorkulturzeit (min)		0	30	60	120
8-MOP	Experiment 1	1053	1333	1667	1765
	Experiment 2	2917	5833	13000	16000
8-IOP	Experiment 1	144	138	107	139
	Experiment 2	221	235	146	184
5'-MA	Experiment 1	< 1000	182	< 91	< 56
	Experiment 2	< 2000	< 133	465	< 73
5,7-DMC	Experiment 1	14	8	2	3
	Experiment 2	8	3	12	8

Tab. 5: Einfluß einer Vorkultur im Dunkel mit den Cumarinderivaten (50 µg/ml) auf die Anzahl der induzierten Arg⁺-Revertanten bei nachfolgender NUV-Bestrahlung (2 Wm⁻², 30 min).

gen Serie ohne Vorkultur im Dunkel auf 100 % gesetzt und als Bezugswert für den Einfluß einer Vorinkubation benutzt. Bei der Interpretation der Kurven ist demnach zu berücksichtigen, daß die Ausgangszellzahl, je nach Toxizität des Cumarinderivats, leicht bis erheblich über dem eingetragenen Wert von 100 % liegt. 5'-MA hat sich in den vorher dargestellten Versuchen als stark toxisches Agens erwiesen; die Überlebensrate ohne Vorkultur dürfte bei den gewählten Bedingungen um oder eher unter 1 % liegen. Demnach muß der Wert der Ausgangszellzahl erheblich über dem 100%-Wert der Kurve (= Überlebensrate ohne Vorkultur) angesetzt werden. Der in den 5'-MA-Kurven auftretende Anstieg der Überlebenszellzahl auf das mehr als 10fache entspricht somit einer geringeren Inaktivierung der Zellen nach Vorkultur im Dunkel. Dies bedeutet, daß 5'-MA nach Vorinkubation eine erheblich verringerte Toxizität aufweist verglichen mit der nach sofortiger Bestrahlung.

Trotz dieser relativ gesehen wesentlich erhöhten Zellzahl nach Vorinkubation traten bei der 5'-MA Serie in 6 von 8 Ansätzen keine Revertanten auf, in den beiden übrigen Ansätzen eine sehr geringe Zahl. Deshalb ist kein Vergleich mit den anderen Cumarinderivaten bezüglich der mutagenen Wirkung nach Vorkultur im Dunkel mit 50 µg/ml möglich.

Die Mutagenität von 8-MOP wird bei der höheren Konzentration durch die vorgeschalteten Dunkelperioden zeitabhängig erhöht (Tab. 5). Bei den Ergebnissen mit dem zweiten linearen Derivat 8-IOP dagegen zeigt sich, daß durch die Vorkultur auch nach höheren Konzentrationen kein fördernder Einfluß auf die Reversionsrate eintritt. Die Werte mit 5,7-DMC lassen keine gerichtete Beeinflussung durch die vorgeschalteten Dunkelphasen erkennen.

2.4. Diskussion der Ergebnisse im Algentestsystem

2.4.1. Reaktionen der Furocumarine mit der DNA

Seit mehr als zehn Jahren bemühen sich Wissenschaftler den Wirkungsmechanismus der Furocumarine aufzuklären (Musajo et al, 1965; Krauch et al, 1967; Krauch und Farid, 1967; Musajo et al, 1967a; Musajo et al, 1967b; Musajo und Rodighiero, 1970; Dall'Acqua et al, 1971; Dall'Acqua et al, 1974a; Dall'Acqua et al, 1974b; Scott et al, 1976; Dall'Acqua et al, 1978a; Dall'Acqua et al, 1978b; Lown und Sim, 1978; Dall'Acqua et al, 1979). Es ist bekannt, daß neben Photoreaktionen mit der DNA auch in geringem Ausmaß Photooxidationen ablaufen. Diese Photooxidationsprozesse, ebenso wie Dimerisierungsvorgänge der Verbindungen im Licht, werden für die Mutationsauslösung jedoch als nicht wesentlich betrachtet (Dall'Acqua et al, 1979). Inwieweit sich weitere photochemische Reaktionen mit RNA (Rodighiero et al, 1970; Averbek et al, 1978; Wollenzien et al, 1978), Proteinen, Enzymen oder Ribosomen (Meffert et al, 1976; Veronese et al, 1979a; Veronese et al, 1979b; Yoshikawa et al, 1979) indirekt über Beeinflussung von Stoffwechselprozessen oder Membranveränderungen auf die biologische Wirkung der Furocumarine auswirken, ist bisher nicht geklärt. Es gilt jedoch heute als gesichert, daß die genetische Aktivität der Furocumarine im wesentlichen auf ihrer Photoreaktion mit der DNA beruht.

Die Reaktion der Furocumarine mit der DNA wird von Dall'Acqua et al (1979) als 2-Stufen-Prozeß dargestellt: der erste Schritt besteht in einer Komplexbildung zwischen den Furocumarinmolekülen und der DNA, der zweite Schritt beinhaltet die Ausbildung von kovalenten Bindungen durch nachfolgende Bestrahlung mit langwelligem UV.

Die Komplexbildung der Furocumarine mit DNA wurde bereits 1966 von Dall'Acqua und Rodighiero beschrieben; sie ist lichtunabhängig, läuft dementsprechend also auch im Dunkel ab (Dall'Acqua und Rodighiero, 1966; Dall'Acqua et al, 1978c). Die Furocumarinmoleküle schieben sich dabei interkalierend zwischen zwei DNA-Basen, ähnlich den Interkalationskomplexen der Acridine oder des Aktinomycins. Die Ausbildung von Bindungen erfolgt über H-Brücken und van der Waals'sche Kräfte und ist daher relativ schwach und reversibel. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß diese Art der Bindung an DNA im Dunkel sowohl für biologisch aktive wie auch für biologisch inaktive Derivate beobachtet wurde.

Nach Song und Tapley (1979) spielt die Ausbildung dieses Interkalationskomplexes jedoch eine wichtige Rolle für die nachfolgende Photoreaktion.

Die Furocumarine weisen zwei reaktive Doppelbindungen auf: die 3,4 Doppelbindung am Cumarinring und die 4',5' Doppelbindung am Furanring. Werden diese Doppelbindungen durch NUV angeregt, so wird eine kovalente Bindung mit einer Pyrimidinbase, meist Thymin, ausgebildet. Dabei wird Thymin über seine 5,6 Doppelbindung an den Cumarinring (3,4 Doppelbindung) bzw. an den Furanring (4',5' Doppelbindung) addiert. Aufgrund unterschiedlichen Fluoreszenzverhaltens dieser beiden Monoaddukte konnte nachgewiesen werden, daß sowohl die 3,4 als auch die 4',5' Doppelbindung tatsächlich eine Bindung mit DNA-Basen eingeht (Musajo et al, 1970). Nach Untersuchungen von Dall'Acqua et al (1979) liegt jedoch der Anteil der 3,4 Monoaddukte wesentlich höher als der der 4',5' Monoaddukte. In neueren Arbeiten mit Hilfe der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie wird eine Photocycloaddition über radikalische Zwischenstufen diskutiert (Canistraro und van de Vorst, 1978).

Da das 3,4 Monoaddukt nicht in der Lage ist, Licht aus dem langwelligen UV-Bereich zu absorbieren, erfolgt unter diesen Bedingungen keine weitere Reaktion (Dall'Acqua et al, 1979). Das 4',5' Monoaddukt dagegen kann bei Anregung durch NUV mit seiner noch freien Doppelbindung weiterreagieren: es bildet mit einer zweiten Pyrimidinbase des gegenüberliegenden Stranges der DNA ein Biaddukt. Als Folge solcher Biadduktbildung können Quervernetzungen der DNA, sog. cross-links, auftreten, die zu einer Blockierung der DNA-Replikation und unter Umständen zu Strangbrüchen führen.

Bis vor kurzem galt als sicher, daß nur linear gebaute Furocumarine die Fähigkeit zur Biadduktbildung besitzen. Erst seit der 1978 von Lown und Sim beschriebenen cross-link Bildung durch Angelicin (10-12 %) werden mögliche Biaddukte - wenn überhaupt jedoch in sehr geringem Maß - auch bei angularen Derivaten diskutiert. Averbek und Moustacchi (1979) bestätigen das Auftreten von cross-links durch Angelicin nur für in vitro Versuche mit DNA, dies soll jedoch nach ihren Ergebnissen, ebenso wie nach jenen von Ashwood-Smith und Grant (1977), nicht für in vivo Bedingungen zutreffen.

Das einfache Cumarin 5,7-DMC soll ähnlich den Furocumarinen mit der DNA photochemisch reagieren (Harter et al, 1976). Während jedoch bei den Furocumarinen die Reaktion über den Triplet-Zustand eine große Rolle spielt (Bensasson et al, 1978; Ou et al, 1978), wird bei 5,7-DMC hauptsächlich eine Photocycloaddition über den Singulet-Zustand angenommen (Shim und Chae, 1979).

2.4.2. Mutagene Wirkung der Cumarinderivate

Von allen geprüften Cumarinderivaten zeigt 8-MOP die stärkste mutagene Wirkung in Abhängigkeit von der Dosis. Die Chlamydomonas-Zellen reagieren in verschiedener Weise auf Veränderung von Substanzkonzentration und NUV-Dosis. Bei Erhöhung der Konzentration steigt die Revertantenzahl in gleichem Maß an wie die Konzentration; man erhält eine einfache direkte Beziehung im dosisabhängigen Bereich. Der Sättigungseffekt könnte zusätzlich durch eine Abschirmung der Bestrahlung durch ungebundene Moleküle verstärkt werden. Eine Erhöhung der NUV-Dosis bei konstanter Bestrahlungszeit und konstanter Substanzkonzentration wirkt sich in einem wesentlich steileren Anstieg der Revertanten aus als zu erwarten ist. Im dosisabhängigen Bereich liegt damit sicher keine Reziprozität von Konzentration und NUV-Dosis vor. Die Bedeutung des NUV für die Revertanteninduktion ist nach den Ergebnissen mit Chlamydomonas wesentlich höher einzustufen als der Einfluß der Konzentration. Dies könnte mit dem Anteil der Mono- bzw. Biaddukte zusammenhängen, die unter den jeweiligen Bedingungen gebildet werden. Bei höheren NUV-Dosen ist die Überführung von Monoaddukten zu Biaddukten sehr viel wahrscheinlicher als bei niederen Dosen.

Averbeck und Averbeck (1978) vermuten, daß durch niedere Bestrahlungsdosen andere Typen von Schäden vorwiegend gesetzt werden als durch hohe NUV-Dosen. Die cross-link Bildung in vitro ist zwar die gleiche nach vergleichbar hohen totalen Dosen von NUV (Averbeck und Averbeck, 1978), dies muß jedoch nicht unbedingt für in vivo Verhältnisse zutreffen. Allein durch die Bestrahlung einer Suspension von Zellen und einer nicht frei vorliegenden DNA sind andere Voraussetzungen gegeben. Die experimentellen Ergebnisse

sprechen eher dafür, daß in vivo verschiedene Typen von Schäden bevorzugt bei niederen bzw. bei hohen NUV-Dosen verursacht werden.

Burger und Simons (1979) beschreiben einen linearen Zusammenhang zwischen NUV-Dosis und Konzentration - bezogen auf die mutagene Wirkung von 8-MOP - bei ihren Versuchen mit menschlichen Hautfibroblasten. Ihre Folgerung muß jedoch kritisch betrachtet werden, da sie die Reziprozität von Konzentration und NUV-Dosis aus nur zwei Produkten ableiten, ohne sich durch einen Kurvenverlauf beider Parameter zu vergewissern, ob die verwendeten Konzentrationen im dosisabhängigen Bereich liegen.

Die Komplexbildung im Dunkel soll nach Ansicht mehrerer Autoren die nachfolgende Photoreaktion positiv beeinflussen (Rodighiero et al, 1970; Schimmer, 1978; Bordin et al, 1979a). Für 8-MOP wird angenommen, daß etwa 60 % des Dunkelkomplexes überführt werden zum Photoaddukt (Tjerneld et al, 1979). Die erwartete mutationsfördernde Wirkung einer Dunkelvorinkubation wird durch die Experimente bestätigt: Bei einer Konzentration von 50 µg/ml 8-MOP ist der Anstieg der Reversionsrate deutlich erkennbar. Bis zu einer Vorkulturzeit von 60 min tritt eine klare Zeitabhängigkeit der Reaktion auf. Nach 60 min dürfte der Großteil der möglichen Interkalationskomplexe gebildet sein, bei noch längerer Vorinkubation kann keine wesentliche Verbesserung der Ausgangslage für die nachfolgende NUV-Bestrahlung mehr geschaffen werden: Der fördernde Effekt auf die Mutationsauslösung nimmt nur mehr relativ schwach zu. Andererseits muß jedoch auch berücksichtigt werden, daß die erreichten Revertantenzahlen bereits im Sättigungsbereich für 8-MOP liegen. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml 8-MOP dürfte die Menge der im Dunkel gebundenen Moleküle zu gering sein, um eine deutliche Steigerung der Photoreaktion zu bewirken.

Das zweite lineare Furocumarinderivat 8-IOP, ebenfalls in 8-Stellung substituiert, zeigt eine wesentlich langsamere Wirkungsgeschwindigkeit als 8-MOP. Äquimolare Substanzkonzentration bewirkt bei gleicher Bestrahlungsstärke und Bestrahlungsdauer erheblich weniger Effekt. Auf eine Veränderung der Konzentration reagieren die Algenzellen bei 8-IOP-Behandlung prinzipiell in gleicher Weise wie bei 8-MOP-Behandlung. Das gleiche gilt für die Veränderung der NUV-Dosis: Beide linearen Derivate zeigen relativ eine gleich stark erhöhte Mutagenität in Bezug auf die NUV-Dosis (Abb. 15). Unter optimalen Bedingungen erreicht 8-IOP vergleichbar hohe Revertanzahlen.

Alle Verhaltensweisen auf Veränderungen der Behandlungsbedingungen weisen darauf hin, daß die beiden linearen Derivate prinzipiell gleich reagieren. Der Unterschied liegt in der Wirkungsgeschwindigkeit: 8-IOP reagiert unter allen Bedingungen wesentlich langsamer. Daß die Reaktion so verlangsamt abläuft, kann durch verschiedene Faktoren bedingt sein: Neben der geringeren Löslichkeit kommen vor allem sterische Gründe in Frage. So dürfte die Zellpenetration bei 8-IOP bereits verlangsamt ablaufen, die Interkalation in die DNA ist, durch die lange Seitenkette bedingt, wahrscheinlich weniger effektiv. Ebenso ist zu erwarten, daß die Bildung von Mono- und Biaddukten bei Bestrahlung langsamer vonstatten geht. Unter Berücksichtigung der aufgeführten Faktoren ist die Ineffektivität einer Vorkultur im Dunkel auf die nachfolgende Photoreaktion von 8-IOP erklärbar.

Trotz seiner vor allem sterisch bedingten Nachteile zeigt 8-IOP eine dem 8-MOP vergleichbar hohe mutagene Potenz in Abhängigkeit von der Überlebensrate. Die Ergebnisse lassen insgesamt den Schluß zu, daß sich die lange Seitenkette des 8-IOP-Moleküls nur auf die Reaktionsgeschwindigkeit auswirkt, nicht jedoch auf die Reaktionsweise und

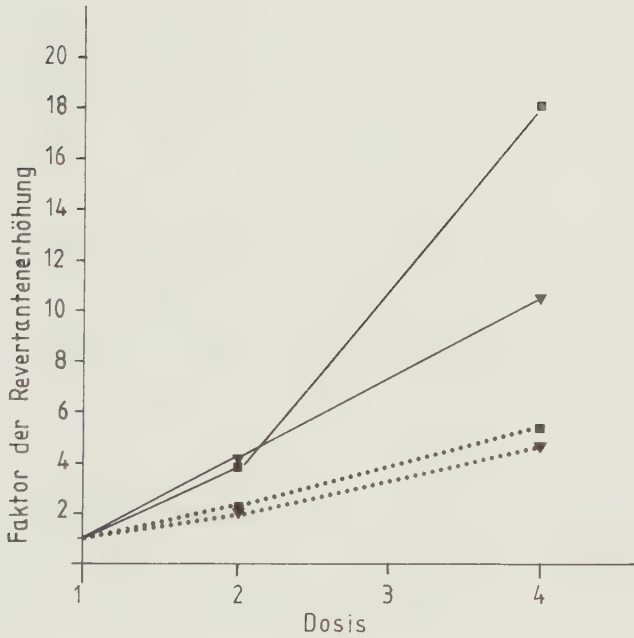


Abb. 15: Vergleichende Darstellung der relativen Erhöhung der Revertanten durch 8-MOP und 8-IOP bei jeweils doppelter Substanz- bzw. NUV-Dosis (siehe Ergebnisse aus 2.3.2., 2.3.3.). Die jeweilige Revertantenzahl bei Dosis 1 ($2,5 \mu\text{g/ml}$ bzw. $0,5 \text{ Wm}^{-2}$) wurde als Bezugswert (Faktor 1) benutzt.

▼ 8-MOP, ■ 8-IOP

..... Substanzkonzentration, — NUV-Dosis

die Reaktionsprodukte. Es kann gefolgert werden, daß 8-IOP in der Lage ist, nach entsprechend verlängerter Behandlungszeit eine ebenso hohe Zahl an Photoaddukten mit der DNA zu bilden wie 8-MOP. Diese Ergebnisse zeigen klar, daß die Einstufung von 8-IOP als nicht mutagenes Agens (aufgrund einer fehlenden photosensibilisierenden Wirkung auf die Haut; Musajo und Rodighiero, 1962; Musajo et al, 1965) nicht aufrecht erhalten werden kann.

5'-MA als Vertreter der angularen Derivate wirkt im Algensystem mutagen, jedoch erheblich schwächer als die linearen Verbindungen. Eine dosisabhängige Wirkung von der Substanzkonzentration ist auch in diesem Fall erkennbar. Die erhaltenen Reversionsraten mußten jedoch in den meisten Fällen durch relativ geringe Révertantenzahlen bestimmt werden.

Bei Veränderung der NUV-Dosis wirkt 5'-MA unregelmäßig. Eine eindeutige Abhängigkeit der Wirkungsstärke von der jeweiligen NUV-Dosis ist nicht ersichtlich. Dieses Verhalten weicht völlig von dem der linearen Derivate ab: Bei diesen war gerade im Fall der NUV-Dosisveränderung die Abhängigkeit von der Dosis besonders ausgeprägt.

Eine zusammenfassende Beurteilung der Experimente ergibt, daß das angulare Derivat 5'-MA als schwach mutagenes Agens eingestuft werden muß. Die Vermutung liegt nahe, daß die höhere mutagene Potenz der linearen Verbindungen auf ihrer Fähigkeit der cross-link Bildung beruht.

Während für Angelicin eine mögliche cross-link Bildung zumindest in vitro beschrieben wird (Lown und Sim, 1978; Averbek und Moustacchi, 1979), halten Averbek et al (1979) die Ausbildung von cross-links durch das sehr reaktive angulare Derivat 4,5'-Dimethylangelicin nicht für möglich.

Ebenso muß nach Bordin et al (1979b) 5-Methylangelicin als rein monofunktionales Agens angesehen werden. Aus den bisher bekannten Daten kann eine cross-link Bildung für 5'-MA nicht ganz ausgeschlossen werden, erscheint aber sehr unwahrscheinlich. Eine geringe Fähigkeit zur Biaddukt-bildung, möglicherweise auch mit nicht gegenüberliegenden Basen, könnte allerdings die unregelmäßige mutagene Wirkung dieser Substanz erklären.

Ein Vergleich der mutagenen Wirksamkeit der linearen bifunktionalen Furocumarine, die fähig sind, Monoaddukte und Biaddukte zu bilden, mit der des angularen Derivats 5'-MA, welches mit großer Wahrscheinlichkeit als rein monofunktionales Agens angesehen werden muß, legt nahe, die Bildung von cross-links als wesentliche Ursache der Mutagenität im Testsystem *Chlamydomonas* zu postulieren. Wenn Monoaddukte ebenso wesentlich an der Ausprägung der Mutagenität beteiligt wären, müßte eine regelmäßig auftretende, dosisabhängige mutagene Aktivität im Fall von 5'-MA erwartet werden, da die Bildung von Monoaddukten bei gleichen Versuchsbedingungen immer in vergleichbarem Maß erfolgen müßte. Gerade die unregelmäßige Wirksamkeit des 5'-MA ist damit als Argument gegen eine wesentliche Beteiligung der Monoaddukte an der mutagenen Wirkung zu sehen.

Neben den vieldiskutierten Photoreaktionen der Furocumarine mit DNA wäre in diesem Fall auch eine Beteiligung von Photooxidationsprozessen in Erwägung zu ziehen, die durch eine geringe Bildung von Singulett-Sauerstoff eine schwache, je nach Bedingungen wahrscheinlich nicht streng reproduzierbare Mutagenität induzieren könnten (Poppe und Grossweiner, 1975; Gutter et al, 1977; de Mol und Beijersbergen van Henegouwen, 1979). Bei den linearen bifunktionalen Verbindungen würde eine solche schwache schwankende Wirksamkeit durch die starke mutagene Aktivität aufgrund der

Photoreaktion mit der DNA überdeckt werden und nicht in Erscheinung treten.

5,7-DMC als einfaches Cumarinderivat kann nur als monofunktionales Agens unter Beteiligung seiner 3,4 Doppelbindung wirken. Unter den geprüften Bedingungen zeigt sich keine merkliche mutagene Wirksamkeit dieser Substanz in Verbindung mit NUV. Selbst unter verbesserten Voraussetzungen für die Photoreaktion mit der DNA, nämlich einer Vor-
kultur im Dunkel - Ou et al (1976) haben eine Interkalation von 5,7-DMC zwischen die DNA-Basen im Dunkel nachgewiesen - tritt keine deutliche photomutagene Wirkung auf.

Dies scheint im Widerspruch zu stehen mit Ergebnissen von Averbek und Moustacchi (1980), die bisher als einzige eine mutagene Wirkung von 5,7-DMC in Verbindung mit NUV beschrieben haben. Allerdings ist anzumerken, daß diese Untersucher in ihrem Hefetestsystem eine 10fach höhere Bestrahlungsdosis verwenden mußten, um 5,7-DMC bezüglich seiner mutagenen Wirkung mit den anderen untersuchten Substanzen Psoralen, 8-MOP, 3-Carbethoxy-psoralen und Angelicin "vergleichen" zu können. Bei einer NUV-Dosis von 2 kJm^{-2} ergab sich bei *Saccharomyces* folgende Reihenfolge der induzierten Mutanten/ 10^8 Überlebende:

8-MOP	2000
Angelicin	5
5,7-DMC	2.

Diese Werte entsprechen von ihrer Abstufung her durchaus den Ergebnissen mit *Chlamydomonas* (Werte für Angelicin: Dietz, 1980).

5,7-DMC dimerisiert im Licht durch C_4 -Cycloaddition der 3,4 Doppelbindungen (Shim et al, 1978). Durch diese Dimerbildung steht ein Teil der Moleküle nicht mehr für eine Photoreaktion mit der DNA zur Verfügung, zudem ist eine

eventuelle Abschirmung des NUV durch ungebundene dimerisierte Moleküle möglich.

Nach Averbek et al (1979) sollen an den Photoreaktionen der angularen Furocumarine v.a. die 3,4 Doppelbindungen beteiligt sein, wogegen die 4',5' Doppelbindungen wenig reaktiv zu sein scheinen. Demnach müßte, wenn 5,7-DMC den Furocumarinen ähnlich reagiert, die mutagene Aktivität von 5,7-DMC und von Angelicin durch einen etwa vergleichbar hohen Dosisbereich auslösbar sein. Dies ist jedoch nicht gegeben. Durch unsere Ergebnisse im Algentestsystem kann die Annahme, daß 5,7-DMC den Furocumarinen aufgrund seiner Wirkungsweise her zuzuordnen wäre, nicht bestätigt werden. Es spricht mehr dafür, das einfache Cumarinderivat von seiner Wirkung her nicht direkt mit den Furocumarinen zu vergleichen.

Die Ausprägung der Mutagenität wird von einer Reihe verschiedener Faktoren beeinflusst. Was sich letztlich effektiv als mutagene Wirkung einer Substanz im Experiment beobachten läßt, ist Ausdruck einer Summe von zellulären Vorgängen.

In diesem Zusammenhang soll ergänzend das Vorhandensein und die Auswirkung von zelleigenen Reparaturmechanismen diskutiert werden. Diese modifizieren in irgendeiner Weise den durch das Mutagen gesetzten Schaden an der DNA. Unter den bekannten Reparatursystemen findet man solche, die relativ fehlerfrei arbeiten, neben anderen, deren Aktion mit Fehlern behaftet ist, d.h. durch deren Aktivität Veränderungen an der DNA manifest werden. Aufgrund experimenteller Daten läßt sich ableiten, daß Schäden, die durch monofunktionale Furocumarine induziert werden, leichter und besser reparierbar sind als die durch bifunktionale Derivate (Chandra et al, 1973). Für die Reparatur von Monoadd-

dukten gilt ein relativ irrtumsfrei arbeitender Excisions-reparaturmechanismus als wahrscheinlich (Averbeck et al, 1978; Averbeck et al, 1979; Bacchichetti et al, 1979; Coppey et al, 1979; Grant et al, 1979), der zudem recht effektiv zu sein scheint. Im Gegensatz dazu sprechen die Daten im Fall der Biaddukte eher für einen fehlerbehafteten Reparaturmechanismus; dabei werden sowohl Excisionsvorgänge (Grant et al, 1979) wie genetische Rekombination und fehlerbegünstigender SOS-Reparaturmechanismus diskutiert (Cole, 1973; Cole und Sinden, 1974; Sinden und Cole, 1978; Bacchichetti et al, 1979; Ben-Hur et al, 1979).

Damit Zellen überleben können, müssen cross-links repariert werden. Die hohe Mutationsrate durch die bifunktionalen Verbindungen könnte daher in einem engen Zusammenhang stehen mit einer fehlerbehafteten Reparatur der cross-links. Das bedeutet, daß Biadduktbildung indirekt als wesentliche Ursache der Mutagenität angenommen würde. Die starke mutagene Wirksamkeit nur der bifunktionalen Derivate 8-MOP und 8-IOP spricht für diese Korrelation.

Problematisch erweist sich die Interpretation der Ergebnisse mit dem angularen Derivat 5'-MA unter Einbeziehung möglicher Reparaturvorgänge. Die diskutierte cross-link Bildung angularer Derivate ist unter in vivo Bedingungen fast auszuschließen. Bei hohen Dosen von NUV erfolgt jedoch mit erhöhter Wahrscheinlichkeit eine Monoadduktbildung an zwei gegenüberliegenden Stellen der DNA. Bei der Reparatur dieser Monoaddukte müßten - ähnlich der cross-link Reparatur - an diesen Stellen Gaps auftreten. Diese sich überlappenden Gaps bedingen mit hoher Wahrscheinlichkeit Fehler und könnten so mutagene Veränderungen an der DNA manifestieren.

Auch unter Einbeziehung des derzeitigen Wissens um Reparaturprozesse der Photoaddukte ist somit die postulierte we-

sentliche Beteiligung der cross-links an der Mutagenität der geprüften Verbindungen im Testsystem Chlamydomonas aufrechtzuerhalten. Doch kann eine mutagene Wirkung durch Monoaddukte - wenn auch in sehr viel geringerem Ausmaß zu erwarten - nicht ausgeschlossen werden.

2.4.3. Toxische Wirkung der Cumarinderivate

Ein Vergleich der Phototoxizität der geprüften Cumarinderivate ergibt dieselbe Abstufung unter allen untersuchten Behandlungsbedingungen: 8-MOP und 5'-MA wirken stark toxisch auf Chlamydomonas, während 8-IOP einen wesentlich schwächeren Einfluß unter gleichen Bedingungen ausübt. Erst nach entsprechend verlängerter Bestrahlungszeit bewirkt auch 8-IOP eine stark erniedrigte Überlebensrate. 5,7-DMC zeigt unter vergleichbaren Bedingungen keine Phototoxizität im Algentestsystem.

Anders als im Fall der Mutagenität, wo bifunktionale Agenzien in Chlamydomonas in jedem Fall eine eindeutig höhere mutagene Potenz aufweisen als monofunktionale Verbindungen, ist bei der Toxizität eine Zuordnung in dieser Weise nicht möglich. Neben der möglichen Modifizierung der Toxizität durch Reparaturvorgänge darf man nicht ausschließen, daß außer den Photoreaktionen mit der DNA auch unspezifischere Reaktionen der Furocumarine mit der RNA oder Proteinen die Ausprägung der Toxizität mitbeeinflussen.

Vorinkubation im Dunkel wirkt sich in sehr verschiedener Weise auf die nachfolgend induzierte Phototoxizität der einzelnen Verbindungen aus. Bei 8-MOP zeigt sich ein Absinken der Überlebensrate nach vorhergehender Dunkelinkubation. Diese Abnahme der Überlebenden spricht dafür, daß

die Phototoxizität von 8-MOP wesentlich durch die Reaktion mit der DNA bedingt ist, unabhängig davon, welche Photoaddukte die Toxizität entscheidend beeinflussen.

Bei 8-IOP hat eine Vorkultur im Dunkel geringen Einfluß auf die Toxizität der nachfolgenden NUV-Bestrahlung. Die möglichen Gründe hierfür dürften ähnlich gelagert sein wie bei der mutagenen Wirkung nach Vorinkubation bereits angesprochen.

Vorkultur im Dunkel mit 5'-MA bewirkt eine Minderung der Toxizität um mindestens den Faktor zehn. In diesem Fall tritt keine stärkere Ausprägung des Effekts, sondern sogar eine Schutzwirkung durch die Vorinkubation auf. Dieses Ergebnis kann mit dem bisherigen Wissen nicht erklärt werden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß in unserem Algentestsystem Phototoxizität und Photomutagenität nicht notwendigerweise korreliert sein müssen, d.h. eine phototoxische Substanz muß nicht unbedingt photomutagen wirken und umgekehrt. Während man eine starke photomutagene Wirkung nur bei den bifunktionalen Furocumarinen findet, ist eine solche Zuordnung bezüglich der phototoxischen Wirkung nicht möglich. Toxizität vergleichbar starken Ausmaßes kann unter gleichen Bedingungen von monofunktionalen und bifunktionalen Derivaten erreicht werden, wobei allerdings der Kurvenverlauf der Inaktivierung und die Ergebnisse der Vorkultur im Dunkel Hinweise geben, daß möglicherweise die Ausprägung des toxischen Effekts zumindest zum Teil auf verschiedenen Ursachen beruht.

Untersuchungen zur Toxizität einer Substanz genügen also nicht, die Aktivität einer Verbindung einzuschätzen. Falls der therapeutische Effekt eher in Zusammenhang mit der phototoxischen Wirkung steht, wogegen die unerwünschten

Langzeitnebenwirkungen wesentlich mit der Mutagenität korreliert sind, ist es notwendig, Aussagen über beide Parameter zur Beurteilung eines Furocumarins heranzuziehen.

3. Untersuchungen zur Wirkung der Cumarinderivate auf Chromosomen an menschlichen Lymphocyten

3.1. Menschliche Lymphocytenkulturen als Testsystem

3.1.1. Testobjekt und verwendete Methoden

Die Mutagenitätsuntersuchungen an unserem Objekt Chlamydomonas beschränken sich auf das Erfassen und Quantifizieren von Genmutationen. Es ist nicht möglich, mit Hilfe dieses Testsystems Aussagen darüber zu treffen, ob ein Mutagen Schäden an der DNA setzen kann, die auf chromosomaler Ebene sichtbar werden. Das Auftreten von Gen- und Chromosomenmutationen ist jedoch nicht notwendigerweise korreliert, sondern beide Mutationstypen können durchaus verschieden ausgeprägt sein.

Das Aufdecken von Veränderungen an Chromosomen, die eventuell durch die Cumarinderivate induziert werden, erforderte daher die Einführung eines neuen Testsystems. Ein geeignetes Objekt für unsere Untersuchungen stellen menschliche Lymphocyten dar. Im wesentlichen bietet dieses Objekt folgende Vorteile: Verfügbarkeit einer großen Anzahl von menschlichen Zellen; praktikable Kultivierungsmethode; Vorhandensein von relativ guten Präparationstechniken; niedrige spontane Chromosomenaberrationsrate. Die Nachteile dieses Testsystems sind in der Asynchronität der Kulturen und vor allem in der sehr arbeitsaufwendigen Auswertung zu sehen.

Die klassische Methode zur Ermittlung der chromosomenschädigenden Aktivität von Verbindungen stellt das Erfassen der Chromosomenaberrationsrate dar. Als Aberrationstypen werden

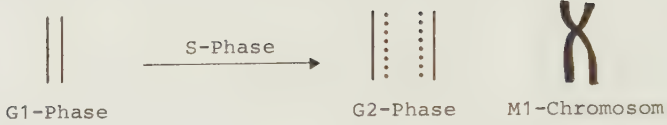
bei den Lymphocyten in der Regel Gaps, Brüche und Translokationen unterschieden.

Seit 1972 wurde in Zellkulturen eine neue Methode entwickelt, durch die eine chromosomenschädigende Aktivität eines Agens ebenfalls erfaßt werden kann: Es wird die Rate der Schwesterchromatidaustausche (sister chromatid exchanges; SCEs) bestimmt. Dieser sog. SCE-Test wird als sensiblerer Indikator für DNA-Schäden als das Auftreten der Aberrationen diskutiert (Latt, 1974; Beek und Obe, 1975; Kato und Shimada, 1975; Perry und Evans, 1975; Solomon und Bobrow, 1975).

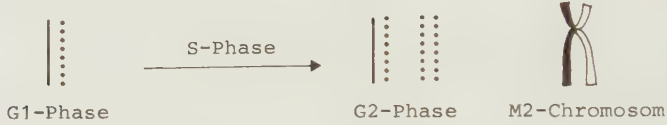
Durch Verwendung von 5-Bromdesoxyuridin (BrdU), das als Basenalogon anstelle von Thymin in die DNA inkorporiert wird, kann eine unterschiedliche Anfärbung der Chromatiden eines Chromosoms erreicht werden. Nach zwei aufeinanderfolgenden Zellzyklen in Anwesenheit von BrdU unterscheiden sich die beiden Chromatiden eines Chromosoms: In einer Chromatide ist das Thymin nur in einem Strang der DNA durch BrdU substituiert, in der anderen in beiden Strängen (semikonservative Replikation). Der so entstandene Unterschied im molekularen Aufbau der DNA läßt sich an den fixierten Chromosomen mit Hilfe spezifischer Färbetechniken im Lichtmikroskop sichtbar machen. Die zweifach substituierte Chromatide vermag kaum Giemsa-Farbstoff zu binden und erscheint daher hell, während sich die einfach substituierte Chromatide normal dunkel anfärbt (Abb. 16).

An den so dargestellten Chromosomen beobachtet man regelmäßig SCEs als reziproke Austauschstücke von Nukleoprotein zwischen den differentiell gefärbten Chromatiden. Man vermutet, daß die Mehrzahl der SCEs genetisch neutral ist (Latt, 1979).

1. Zellzyklus:



2. Zellzyklus:



3. Zellzyklus:

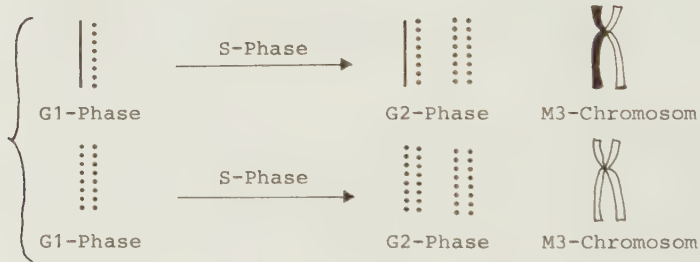


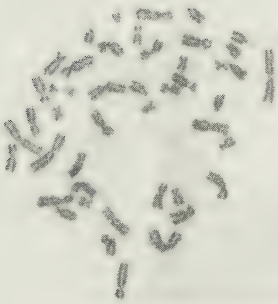
Abb. 16: Schematische Darstellung des BrdU-Einbaus in die DNA für drei aufeinanderfolgende Zellzyklen (Darstellungseinheit: DNA-Doppelstrang).

———— nativer DNA-Strang

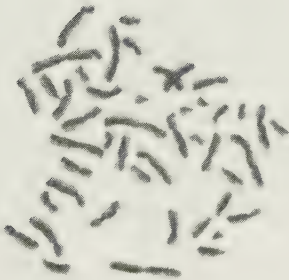
..... BrdU-substituierter DNA-Strang

M1: erste Metaphase, M2: zweite Metaphase,

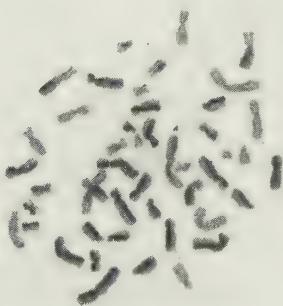
M3: dritte Metaphase



M1: erste Meta-
phase



M2: zweite Meta-
phase



M3: dritte Meta-
phase

Abb. 17: Darstellung der verschieden angefärbten Metaphasen

Als "Nebenprodukt" der SCE-Färbung erhält man in den Präparaten eine unterschiedliche Darstellung der Metaphasen von Zellen, die einen, zwei oder drei Zellzyklen in Anwesenheit von BrdU durchlaufen haben. Entsprechend dem Einbauschema des BrdU und dem Färbeverhalten der Chromatiden weisen in einer sog. ersten Metaphase (M1), d.h. nach Einbau von BrdU für einen Zellzyklus, alle Chromosomen eine dunkle Färbung auf, die Chromosomen einer zweiten Metaphase (M2) sind alle differentiell gefärbt, bei einer dritten Metaphase (M3) treten sowohl differenziert gefärbte als auch ganz helle Chromosomen gleichzeitig etwa im Verhältnis 1:1 auf (Abb. 17).

Der Anteil des jeweiligen Metaphasetyps an der Gesamtzahl vorhandener Metaphasen erlaubt eine zuverlässigere Aussage über eine Wachstumsbeeinflussung der Lymphocyten als der bisher häufig verwendete Mitoseindex. Durch Anwendung dieser BrdU-Technik kann man den anfangs erwähnten Nachteil der Asynchronität der Kulturen umgehen, da man praktisch nur synchron gewachsene Zellen in die Auswertung miteinbezieht, die gleichzeitig in die zweite Mitose eintreten.

3.1.2. Ausgangssituation und Problemstellung

Biologische Aktivitäten von Furocumarinen im Dunkel sind bekannt. Bereits 1957 wurde eine Antitumorwirkung dieser Stoffe beschrieben (O'Neal und Griffin, 1957; Vermeil und Tsetlin, 1964). Unsere früheren Untersuchungen an Chlamydomonas zeigten, daß zwar die Zellteilung durch 8-MOP im Dunkel gehemmt war, eine mutagene Wirkung konnte jedoch - im Gegensatz zu Ergebnissen mit Bakterien (Clarke und Wade, 1975; Bridges und Mottershead, 1977; Ashwood-Smith, 1978) - nicht nachgewiesen werden (Schirmer und Hauber, 1977). An

Lymphocyten ist bisher unter Dunkelbedingungen nur von 8-MOP ein hemmender Effekt auf die Zellproliferation nachgewiesen (Lischka und Decker, 1978; Lischka, 1979). Die Dunkelwirkung der Cumarinderivate auf Lymphocyten wurde daher mit dem SCE-Test untersucht. Die Ergebnisse sollten mit den bereits vorliegenden Ergebnissen an Algen verglichen werden.

Die vier Cumarinderivate sollten außerdem im Lymphocyten-system qualitativ auf ihre Wirksamkeit in Verbindung mit NUV geprüft werden. Dabei war nicht beabsichtigt, die einzelnen Verbindungen unter jeweils für sie optimalen Bedingungen zu testen. Es wurde vielmehr ein Vergleich der Substanzen untereinander angestrebt, der eine Anordnung bezüglich ihrer Wirkungsstärke bei gleichen Versuchsbedingungen erlauben würde. Diese Reihenfolge der Derivate sollte mit der im Algensystem erhaltenen verglichen werden. Gleichsinnige Ergebnisse würden die Aussagekraft des Algensystems stärken, abweichende Ergebnisse könnten andererseits zusätzliche Informationen über die Aktivität der untersuchten Verbindungen liefern.

Das Hauptgewicht in Bezug auf Testmethoden wurde auf die Durchführung des SCE-Tests gelegt. Zusätzlich wurden Versuche zur Bestimmung der Chromosomenaberrationsrate und zur Ermittlung von Angaben über die Wachstumsbeeinflussung der Lymphocytenkulturen durch die Cumarinderivate durchgeführt.

3.2. Material und Methoden

3.2.1. Kulturansatz und Präparation

Das Blut wurde durch eine Venenpunktion gewonnen und in ein steriles Gefäß gebracht, welches als Gerinnungshemmer Thrombovetren (0,5 ml) enthielt. Als Kultur- wie als Behandlungsgefäße dienten sterile Plastikfläschchen (25 cm² Oberfläche) der Firma Falcon.

Die Lymphocyten wurden nach der leicht modifizierten Methode von Moorhead et al (1960) angesetzt. Jede Kultur enthielt 4,5 ml penicillinhaltiges (600 I.E. Penicillin/ml, Grünenthal) Medium Ham's F-10, 0,5 ml Fetal Bovine Serum (abs) und 15 Tropfen Vollblut. Um die Zellteilung zu stimulieren wurden jeder Kultur 0,2 ml ungereinigtes Phytohämagglutinin (Bacto Difco) zugesetzt. Die Inkubation fand bei 310 K im Dunkel statt. Bei den Ansätzen zur Bestimmung der SCE-Rate wurde zusätzlich das Basenanalogon BrdU zugegeben. Der Zugabezeitpunkt variierte je nach Versuchsreihe und ist an entsprechender Stelle im Ergebnisteil angegeben. Die BrdU-Konzentration betrug 8 µg/ml, berechnet als Endkonzentration in der Kultur. Zwei Stunden vor der Aufbereitung erhielt jede Kultur 0,2 ml Colcemid, entsprechend einer Endkonzentration von $2 \cdot 10^{-5}$ g/l, um die Zellteilung in der Metaphase zu blockieren und damit Zellen in Mitose anzuhäufen. Das Colcemid wurde von der Firma Fluka bezogen.

Die Vergrößerung des Zellumens vor der Fixierung wurde durch eine hypotone Behandlung mit KCl erreicht. Die Zellen wurden nach einer Kultivierungsdauer von 72 h abzentrifugiert (8 min, 5 000 U/min), in der hypotonen Lösung (0,7 % KCl, 310 K) aufgeschüttelt und nach 3 min wieder abzentrifugiert. Danach wurde mit Methanol/Eisessig (3 + 1) fixiert (mindestens

30 mip, 277 K) und mehrmals mit der Fixierlösung ausgewaschen. Die fixierten Zellen wurden auf eiswassergekühlte Objektträger getropft und luftgetrocknet. Anschließend lagerten die Chromosomenpräparate mindestens 3 Tage im Dunkel.

3.2.2. Färbungen

Es wurden zwei Färbemethoden verwendet: die Fluoreszenz plus Giemsa-Färbung (FPG-Färbung), modifiziert nach Perry und Wolff (1974), für die BrdU-markierten Präparate, und die konventionelle Orcein-Eisessig-Färbung bei den nicht markierten Präparaten.

3.2.2.1. Fluoreszenz plus Giemsa-Färbung

Für die Färbung wurden folgende Lösungen benötigt:

KCl + NaCl-Puffer: 2,2368 g KCl + 8,7660 g NaCl in 1000 ml Aqua dest.

Stammlösung: 5 mg "Hoechst 33258"-Fluorochrom (Bis-benzimid, Serva) auf 100 ml KCl + NaCl-Puffer.

Gebrauchslösung: 2 ml Stammlösung + 98 ml KCl + NaCl-Puffer.

Gepuffertes Wasser: 20 ml Puffer pH 6,88 (Merck) + 80 ml Aqua dest.

SSC 10fach: 87,7 g NaCl + 44,1 g Na-citrat in 1000 ml Aqua dest.

Giemsa-Lösung (7%): 20 ml Puffer pH 6,88 + 7 ml Giemsa (Merck) + 73 ml Aqua dest.

Die Chemikalien wurden, sofern nichts anderes angegeben, von der Firma Merck bezogen.

Die Durchführung der Färbung erfolgte nach dieser Vorschrift:

1. 10 min Präparate in Gebrauchslösung stellen; dabei die Lösung vor Licht schützen.
2. Präparate kurz mit gepuffertem Wasser abspülen, dann in eine flache Schale legen, mit gepuffertem Wasser gerade überschichten.
3. 30 min im gepufferten Wasser mit UV₂₅₄ bestrahlen (Abstand: 20 - 30 cm).
4. 20 min inkubieren mit 10fach SSC bei 333 K.
5. 5 min färben mit 7%iger Giemsa-Lösung.
6. Präparate gut abspülen mit Aqua dest.

Die trockenen Präparate wurden nach mindestens 15minütigem Belassen in Xylol mit Eukitt (Kindler) eingedeckt.

3.2.2.2. Orcein-Eisessig-Färbung

Die Präparate wurden für mindestens 2 h in Orceinlösung (5 g Orcein/300 ml Eisessig + 200 ml Aqua dest.) gestellt. Danach wurden sie kurz in 45%iger Essigsäure geschwenkt, durch eine Alkoholreihe entwässert und für mindestens 15 min in Xylol belassen. Das Eindecken der Präparate erfolgte ebenfalls mit Eukitt.

3.2.3. Testsubstanzen und Applikation

Als Testsubstanzen wurden die bereits in 2.2.2. beschriebenen vier Verbindungen 8-MOP, 8-IOP, 5'-MA und 5,7-DMC verwendet.

Da Aceton bereits in geringen Mengen das Lymphocytenwachstum stark beeinträchtigt, mußte es hier als Lösungsmittel

ausgeschlossen werden. Da die Lymphocyten jedoch auch auf die anderen in Frage kommenden Lösungsmittel (DMSO, Äthanol) sehr sensibel reagieren, wurde auf ihre Verwendung generell verzichtet, um jeglichen Nebeneffekt auszuschließen. Die eingewogenen Endkonzentrationen der Substanzen betrugen 0,1 mM/l, die wässrigen Stammlösungen lagen jedoch als Suspensionen vor. Unter Berücksichtigung der wasserlöslichen Mengen der Testverbindungen (8-MOP 38 µg/ml, 8-IOP 8 µg/ml) dürften die Konzentrationen 10^{-4} bis 10^{-5} M/l betragen. Die Zugabemenge lag bei 0,2 ml pro Kultur und beeinträchtigte damit kaum die Konzentrationsverhältnisse im Nährmedium. Bei den Vorversuchen in 3.3.1.1. wurden die Substanzen in einer Endkonzentration von 0,01 mM/l verwendet.

3.2.4. Verwendete Leuchtstoffröhren

Als Lichtquelle für das NUV-Feld wurden vier Leuchtstoffröhren der Marke Philips (LL 20 W, Typ Philips TL 20 W/08, F 20 T₁₂ BLB) verwendet. Diese Röhren waren über dem Brutschrank, der mit einer Plexiglasabdeckung versehen war, angebracht. Die Messungen zur Ermittlung der Raumbestrahlungsstärke erfolgten wieder nach Hartmann (1978); die Raumbestrahlungsstärke betrug bei dem verwendeten Abstand $8,5 \text{ Wm}^{-2}$. Bei der Messung wurde der Anteil, der durch das Plexiglas der Brutschrankabdeckung und der verwendeten Falcon-Gefäße verlorengeht, bereits berücksichtigt.

3.2.5. Versuchsdurchführung

Bei den Dunkelversuchen erfolgte die Agenszugabe 48 h nach

Kulturansatz. Nach der Zugabe wurden die Kulturansätze im Schüttelwasserbad bei 310 K unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Agenzien wurden bis zur Fixierung im Medium belassen, die Einwirkungszeit betrug somit 24 h.

Bei den NUV-Versuchen wurden die Agenzien in der Regel nach 47 h zugegeben (Abweichungen sind angegeben), bestrahlt wurden die Kulturen 48 h nach Kulturansatz für 5 min mit einer Raumbestrahlungsstärke von $8,5 \text{ Wm}^{-2}$. Nach der Bestrahlung wurde wieder inkubiert.

3.2.6. Cytogenetische Auswertung

Zur Erfassung der SCE-Rate wurden pro Versuchsserie mindestens 25 gut differenziert gefärbte Metaphaseplatten mit 46 Zentromeren lichtmikroskopisch bei 1250facher Vergrößerung ausgewertet. Dabei wurden jeweils in einer der beiden Chromatiden aller Chromosomen die Austauschstellen gezählt und summiert. Diese sind als Grenzstellen zwischen den hellen und den dunklen Chromatidabschnitten erkennbar. Die entsprechenden Bereiche auf den Schwesterchromatiden weisen komplementäre Färbung auf. Terminale Austausche zählen somit einfach, interstitielle Austauschbereiche doppelt (Abb. 18). Austausche in der Zentromerregion wurden nur gezählt, wenn das Vorliegen von Chromatidverdrehungen ausgeschlossen werden konnte.

Aus den einzelnen SCE-Werten einer Versuchsreihe wurde jeweils die durchschnittliche Schwesterchromatidaustauschrate ermittelt:

$$\text{SCE-Rate} = \frac{\sum \text{SCE}}{n} .$$

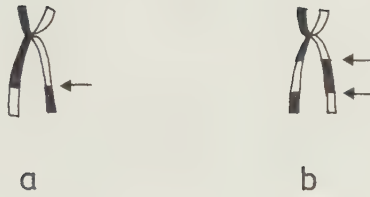


Abb. 18: Auswertung der SCEs

a: terminaler Austausch, 1 SCE

b: interstitieller Austausch, 2 SCEs

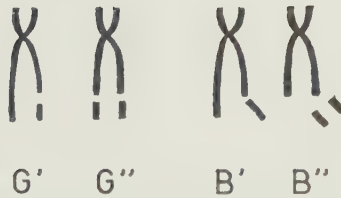


Abb. 19: Unterscheidung von Gaps und Brüchen

G' = Chromatidgap, G'' = Isochromatidgap

B' = Chromatidbruch, B'' = Isochromatidbruch

Die Auswertung der konventionell gefärbten Präparate erstreckte sich auf das Erfassen von Gaps, Brüchen und Translokationen. Gaps stellen achromatische Lücken dar, wobei abgetrennt erscheinende Teilstücke der Chromatiden nicht disloziert sind (G' = Chromatidgap, G'' = Isochromatidgap). Spricht man von Chromatidbruch (B') oder Isochromatidbruch (B''), so handelt es sich um eindeutig disloziert liegende Bruchstücke eines Chromosoms (Abb. 19). Translokationen stellen sich dar als Austauschfolgen auf chromatidaler (Translokationsfiguren) oder chromosomaler Basis (atypische und dizentrische Chromosomen; Gebhart, 1970). Zur Ermittlung der Aberrationsrate der beschriebenen Typen wurden jeweils 100 bis 125 Metaphasen pro Versuchsserie ausgewertet.

Jede Kontroll- und Testserie wurde zweifach in Form von Parallelkulturen angesetzt. Die Experimente wurden, abgesehen von Vorversuchen und abklärenden weiterführenden Versuchen, jeweils zweimal (bei den NUV-Versuchen) bzw. viermal (bei den Dunkelversuchen) mit Blut von verschiedenen gesunden Spendern durchgeführt. Dadurch sollte eine individuelle Abweichung bezüglich der Sensitivität weitgehend eliminiert werden.

3.3. Versuche und Ergebnisse

3.3.1. Wirkung der Cumarinderivate im Dunkel

3.3.1.1. Vorversuche zur Wachstumsgeschwindigkeit der Lymphocyten

Für die geplanten Untersuchungen zur SCE-Analyse war es notwendig, eine möglichst hohe Ausbeute an differenzierten Metaphasen in den Präparaten zu erhalten.

Bei Zugabe von BrdU zu Beginn der Kultur ergab sich ein hoher Anteil an dritten Metaphasen und eine relativ geringe Ausbeute an differenzierten (zweiten) Metaphasen (unter 20 %) bei einer Kulturdauer von 72 h. Da die Kultivierungszeit von 72 h als Standard benutzt wird, schien es sinnvoller, den Zugabezeitpunkt des BrdU zu verändern. Als Testzeitpunkte wurden 36 h, 40 h, 44 h und 48 h gewählt. Die untere Grenze ergab sich aus zwei Überlegungen: erstens treten die Lymphocyten frühestens nach einer Latenzzeit von etwa 24 h in den Zellzyklus ein, und zweitens war das Übergewicht der dritten Metaphasen so hoch, daß ein früherer Zugabezeitpunkt nicht angeraten schien. Da es unwahrscheinlich ist, daß die Lymphocyten in weniger als 24 h mehr als zwei Zellzyklen durchlaufen, wurde Zugabe nach 48 h als obere Grenze festgesetzt.

Um gleichzeitig zu prüfen, ob und inwieweit die Anwesenheit der Testagenzien einen Einfluß auf das Lymphocytenwachstum ausüben würde, wurden fünf Versuchsserien durchgeführt, bei denen zu den angegebenen Zeiten nach Kulturbeginn die BrdU-Zugabe erfolgte. Die Testverbindungen wurden nach 48 h zugesetzt (0,01 mM/l). Alle Serien wurden mit demselben Blut innerhalb von 24 h angesetzt. Aus den Serien wurde jeweils

für jeden Zeitpunkt das Verhältnis $M1:M2:M3$ ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt.

Bei 24 h Anwesenheit von BrdU treten in der Kontrolle keine dritten Metaphasen auf. Der Anteil der zweiten Metaphasen liegt jedoch bereits relativ hoch verglichen mit der Zahl der ersten. Den größten Anteil nehmen die zweiten Metaphasen bei 28stündiger Markierung mit BrdU ein; zu diesem Zeitpunkt treten erstmals dritte Metaphasen auf. Erwartungsgemäß erfolgt bei noch längerer Markierungszeit eine schnelle Zunahme der dritten Metaphasen auf Kosten der zweiten. Der Anteil der ersten Metaphasen ändert sich ab dem zweiten Meßpunkt nur geringfügig: dies könnte darauf hinweisen, daß ein kleiner Anteil von Zellen verzögert transformiert wird.

Vergleicht man die Verteilungsmuster, die die verwendeten Testsubstanzen erzeugen, so lassen sich prinzipiell drei Typen unterscheiden:

1. 5,7-DMC verändert die Verteilung im Vergleich zur Kontrolle nicht, d.h. es scheint das Lymphocytenwachstum nicht zu beeinflussen.
2. Durch 5'-MA tritt ein deutlich fördernder Effekt auf die Zahl der zweiten bzw. dann der dritten Metaphasen auf; nach 36stündiger Markierungszeit erreicht der Anteil der dritten Metaphasen mehr als 65 %.
3. 8-MOP und 8-IOP induzieren prinzipiell ähnliche Verteilungsmuster. In beiden Fällen fehlt der Peak der zweiten Metaphasen bei 28stündiger Markierung. Dieser scheint um vier Stunden verschoben, tritt jedoch dann in abgeschwächter Form auf.

Es wurde noch eine zweite Versuchsreihe von fünf Serien durchgeführt, deren qualitative Auswertung die gleichen Tendenzen ergab.

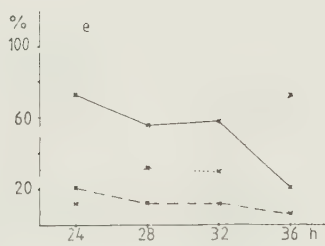
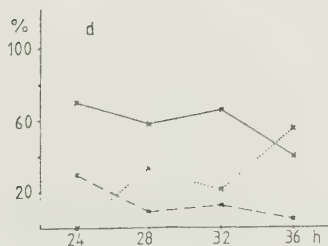
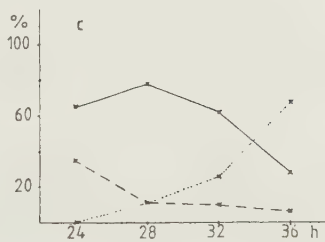
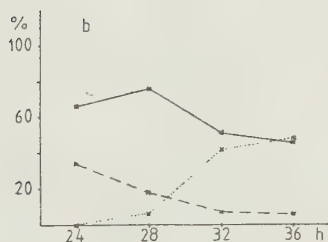
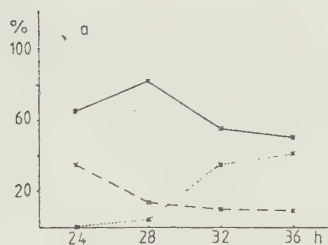


Abb. 20: Verteilungsmuster der Metaphasen nach verschiedenen Zeiten der BrdU-Markierung und Behandlung mit den Cumarinderivaten im Dunkel.

Abszisse: Markierungszeit mit BrdU, Ordinate: Prozentualer Anteil der entsprechenden Metaphasen

Auswertung für jeden Meßpunkt: 100 Metaphasen

a: Kontrolle, b: 5,7-DMC, c: 5'-MA, d: 8-MOP, e: 8-IOP

Die obigen Ergebnisse legen nahe, eine Markierungszeit von 28 oder 32 h zugrunde zu legen. Da die Ausbeute an Mitosen in behandelten Kulturen eher geringer ist als in den Kontrollkulturen wurde der Zugabezeitpunkt des BrdU auf 40 h festgelegt.

3.3.1.2. Einfluß der Cumarinderivate auf die Rate der Schwesterchromatidaustausche

Die vier Cumarinderivate wurden jeweils in parallelen Ansätzen auf die Induktion von SCEs geprüft. Die Experimentserien wurden viermal unabhängig voneinander durchgeführt.

Abb. 21 zeigt die Verteilung der SCEs auf die einzelnen Metaphasen. Prüfung mit dem χ^2 -Verfahren ergab in allen Fällen Poisson-Verteilungen. Anhand der Stabdiagramme kann man bereits ablesen, daß im Vergleich zur Kontrolle bei 8-MOP und 5,7-DMC der Peak der Verteilung leicht nach rechts verschoben ist.

Die Mittelwerte der SCEs/Metaphase sind in Tab. 6 aufgelistet. Die hohe Zahl der ausgewerteten Zellen erlaubte eine statistische Absicherung der gefundenen Unterschiede.

Die Einwirkung von 8-MOP löst unter diesen Bedingungen eine statistisch signifikante Erhöhung der SCE-Rate etwa um 60 % aus. Die Erhöhung konnte bei jedem der durchgeführten Versuche beobachtet werden, war also eindeutig reproduzierbar. Das einfache Cumarin 5,7-DMC zeigt eine schwächere Potenz SCEs zu induzieren, auch hier war die schwache Erhöhung aber in jedem Experiment vorhanden. 8-IOP erweist sich in allen Experimenten als unwirksam. Als einziges der vier untersuchten Agenzien liefert das angulare Derivat 5'-MA keine reproduzierbaren Ergebnisse. Der in Tab. 6 angegebene Wert berechnet sich als Durchschnitt von vier unabhängigen Ver-

	Anzahl der Experimente	Analysierte Metaphasen	SCEs/Metaphase $\pm$ SA	induzierte SCEs/Metaphase	t-Test α	Streuung
K	4	100	6,20 $\pm$ 2,30			2-16
8-MOP	4	100	9,89 $\pm$ 4,38	3,7	$< 0,0002$	2-28
8-IOP	4	100	6,81 $\pm$ 2,64	0,6	$\approx 0,08$	1-15
5'-MA	4	100	7,82 $\pm$ 3,47 *	1,6	$< 0,0002$	1-21
5,7-DMC	4	100	8,12 $\pm$ 3,70	1,9	$< 0,0002$	1-17

Tab. 6: Einfluß der Cumarinderivate auf die SCE-Rate bei 24 h Dunkelbehandlung.

K = Kontrolle, SA = Standardabweichung.

* Versuche fielen nicht einheitlich aus, siehe Text.

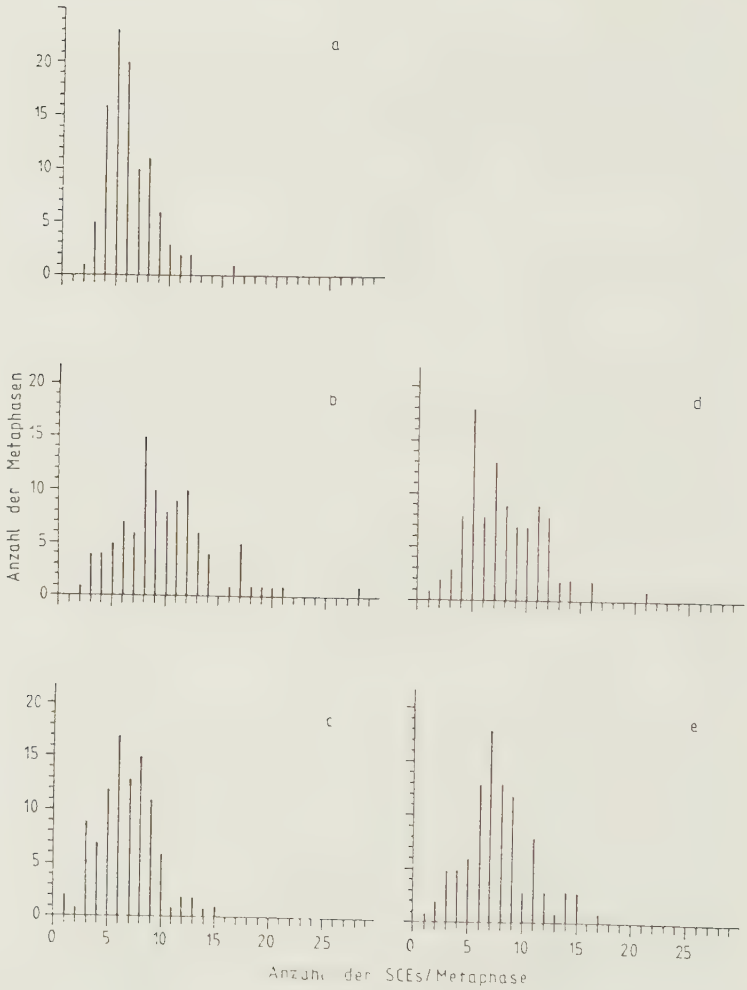


Abb. 21: Verteilung der SCEs auf die einzelnen Metaphasen nach Behandlung mit den Cumarinderivaten im Dunkel.
a: Kontrolle, b: 8-MOP, c: 8-IOP, d: 5'-MA,
e: 5,7-DMC

suchen. Unter diesen vier Versuchen war jedoch nur ein Versuch, in dem eine signifikante Erhöhung der SCE-Rate durch 5'-MA bewirkt wurde, in den anderen drei Versuchen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontroll-SCE-Rate. Als Mittelwert der drei Experimente mit geringer SCE-Rate berechnet man 7,11 SCEs/Metaphase und somit 0,9 induzierte SCEs/Metaphase ($\alpha = 0,05$, d.h. nicht signifikant im t-Test). Die sehr schwache Wirksamkeit von 5'-MA auf die SCE-Induktion ist somit noch durch ein unregelmäßiges Auftreten gekennzeichnet.

3.3.1.3. Einfluß der linearen Furocumarinderivate auf Chromosomenaberrationen

Die Experimente zur clastogenen Wirksamkeit von 8-MOP im Dunkel wurden parallel zu den SCE-Versuchen durchgeführt. Bei jedem Experiment wurden 125 Metaphasen auf Chromosomenaberrationen geprüft. 8-MOP zeigt eine schwach clastogene Potenz, die sich in einer Verdoppelung der Bruch- und Gap-rate ausdrückt. Translokationen konnten nicht beobachtet werden (Tab. 7).

Zusätzlich wurden weitere Versuche mit 8-MOP und 8-IOP durchgeführt. Die Experimente bestätigten einerseits die clastogene Wirkung von 8-MOP und geben andererseits einen Hinweis auf eine ebenfalls schwach clastogene Wirksamkeit von 8-IOP im Dunkel (Tab. 8).

	Anzahl der Experimente	Analysierte Metaphasen	Aberrante Metaphasen (%)	Metaphasen mit Brüchen (%)	Typen von Aberrationen				
					G'	G''	B'	B''	E
K	4	500	5,8	2,6	20	0	4	9	0
8-MOP	4	500	11,6	5,4	34	4	20	9	0

Tab. 7: Clastogene Wirkung von 8-MOP auf menschliche Lymphocyten bei 24 h Dunkelbehandlung.

G' = Chromatidgap, G'' = Isochromatidgap, B' = Chromatidbruch, B'' = Isochromatidbruch, E = Austausch.
K = Kontrolle.

	Analysierte Metaphasen	Metaphasen mit Brüchen (%)	Gaps (G' + G'')	Bruchereignisse (B' + B'')
Kontrolle	100	1,0	5	1
8-IOP	100	5,0	5	7
Kontrolle	100	2,0	2	1
8-MOP	100	5,0	7	6

Tab. 8: Clastogene Wirkung der linearen Furocumarinderivate auf menschliche Lymphocyten bei 24 h Dunkelbehandlung.

3.3.2. Wirkung der Cumarinderivate in Verbindung mit NUV

Zur Orientierung wurden an den Lymphocytenkulturen in Kombination mit NUV-Bestrahlung Vorversuche nur mit 8-MOP durchgeführt. Diese dienten dazu, die Bestrahlungsbedingungen herauszufinden, bei denen einerseits keine starke toxische Wirkung auftrat, aber andererseits bereits Unterschiede in der SCE-Rate von Kontrolle und behandelten Zellen erkennbar waren. Nach mehreren Testreihen zu verschiedenen Bestrahlungszeiten und -intensitäten wurde folgende Kombination als geeignet für quantitative Auswertungen ermittelt: NUV-Bestrahlung mit $8,5 \text{ Wm}^{-2}$ für 5 min. Unter diesen Bedingungen waren noch genügend differenzierte Metaphasen erfaßbar; höhere Bestrahlungsdosen waren nicht möglich, weil dann zu wenig gut differenzierte Metaphasen für quantitative Auswertungen erhalten wurden. Unter den gewählten Bedingungen zeigten sich jedoch bereits deutliche Unterschiede in der SCE-Rate der 8-MOP + NUV-Serie und der Kontrolle (Tab. 9). Es war daher zu erwarten, daß diese Versuchsbedingungen Unterschiede zwischen den einzelnen Cumarinderivaten erkennen lassen würden und damit geeignet waren, eine relative Abstufung der Wirkungsstärke der geprüften Verbindungen unter gleichen Bedingungen zu erhalten.

Ein Auswaschen der Agenzien erwies sich als problematisch, da dadurch sehr große Verluste an Zellen auftraten und eine quantitative Auswertung schwer möglich war. Daher wurde darauf verzichtet, zumal die Wirkung der Substanzen im Dunkel aus den vorhergehenden Versuchen bekannt war.

Zum qualitativen Vergleich der Wirksamkeit der Cumarinderivate in Verbindung mit NUV wurde folgende Experimentserie zweimal durchgeführt: den Lymphocytenkulturen wurde nach 40 h BrdU zugefügt, nach 47 h wurden 0,2 ml der jeweiligen

	Kontrolle	NUV	8-MOP	8-MOP + NUV
Analysierte Metaphasen	50	50	50	50
Gesamtzahl SCEs	334	364	522	711
SCEs/Metaphase	6,7	7,3	10,4	14,2
induzierte SCEs/Metaphase		0,6	3,7	7,5

Tab. 9: Wirkung von 8-MOP in Verbindung mit NUV auf die SCE-Induktion an menschlichen Lymphocyten.

Cumarinstammlösung einpipettiert. Die NUV-Bestrahlung erfolgte nach 48 h für 5 min bei $8,5 \text{ Wm}^{-2}$.

Abb. 22 zeigt die Verteilung der SCEs auf die einzelnen Metaphasen der entsprechenden Serien. Dabei fällt auf, daß bei den mit 8-MOP und 5'-MA behandelten Kulturen jeweils eine Metaphase auftritt, die einen aus dem normalen Bereich fallenden extrem hohen Wert an Austauschen aufweist. Weder bei den Kontrollen (bei allen insgesamt ausgewerteten), noch bei den mit 8-IOP und 5,7-DMC behandelten Kulturen traten solche Extremwerte an SCEs/Metaphase auf. Dagegen wurden auch bei den Vorversuchen mit 8-MOP + NUV zwei Zellen mit einem extrem hohen Austauschwert (≥ 36) erfaßt. Dies spricht für einen eindeutigen biologischen Effekt durch bestimmte Substanzen wie 8-MOP und 5'-MA, sonst müßten derartige SCE-Werte auch in den Kontrollen zu beobachten sein. Solche vereinzelt auftretenden Extremwerte zeigen sich auch nach Behandlung mit bestimmten anderen Agenzien (Bayer, Villejuif, pers. Mitteilung) und werden von vielen Untersuchern in die Auswertung miteinbezogen.

Für die statistische Auswertung wurde systematisch korrigiert, indem jeweils der Maximalwert der SCEs eliminiert wurde. Prüfung mit dem χ^2 -Test ergab, daß die systematisch korrigierten experimentellen Daten für alle Serien Poisson-Verteilungen entsprechen. Bei Anwendung des t-Tests zeigt sich, daß die Behandlung mit 8-MOP + NUV, 5,7-DMC + NUV, und 5'-MA + NUV hoch signifikant erhöhte SCE-Raten liefert. 8-MOP erweist sich als das am stärksten wirksame Agens, das unter den angewendeten Bedingungen einen Anstieg der SCE-Rate um mehr als den Faktor 2 induziert. Bei Berechnung unter Benutzung der Rohdaten (Tab. 11) werden für 5,7-DMC und 5'-MA genau die gleichen Mittelwerte erzielt. Wie bei den Dunkelversuchen bereits dargestellt, zeigt allerdings 5'-MA auch hier in Verbindung mit NUV als einzige

	Analyisierte Metaphasen	SCEs/Metaphase ± SA	t-Test (gegen NUV) α
Kontrolle	50	5,43 ± 2,03	
NUV	50	6,57 ± 2,79	
8-MOP + NUV	50	12,49 ± 3,59	< 0,0027 hoch signifikant
8-IOP + NUV	50	6,49 ± 2,45	≈ 0,16 nicht signifikant
5'-MA + NUV	50	9,22 ± 3,18	< 0,0027 hoch signifikant
5,7-DMC + NUV	50	9,88 ± 3,37	< 0,0027 hoch signifikant

Tab. 10: Einfluß der Cumarinderivate in Verbindung mit NUV auf die SCE-Rate von menschlichen Lymphocytenchromosomen (systematisch korrigierte Daten).
(NUV-Bestrahlung: 8,5 Wm⁻², 5 min; 24 h vor Kulturende)
SA = Standardabweichung

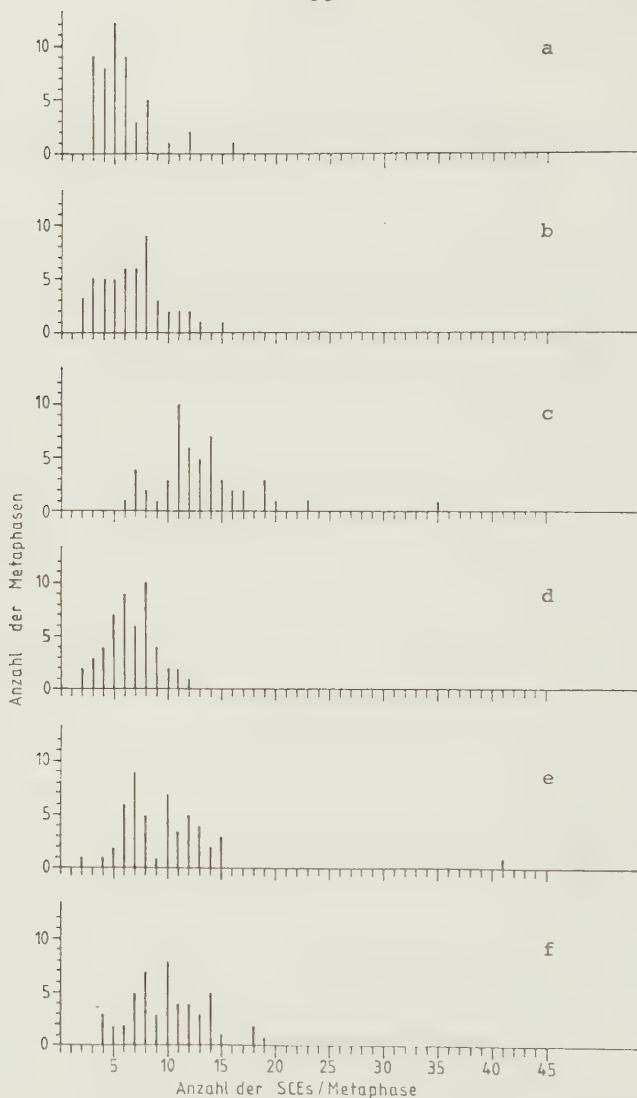


Abb. 22: Verteilung der SCEs auf die einzelnen Metaphasen nach Behandlung mit den Cumarinderivaten in Verbindung mit NUV ($8,5 \text{ Wm}^{-2}$, 5 min).
a: Kontrolle, b: NUV, c: 8-MOP+NUV, d: 8-IOP+NUV, e: 5'-MA+NUV, f: 5,7-DMC+NUV

	Kontrolle	NUV	8-MOP + NUV	8-IOP + NUV	5'-MA + NUV	5,7-DMC + NUV
Gesamtzahl SCEs						
Experiment 1	135	156	319	160	204	244
Experiment 2	147	179	330	170	299	259
SCEs/Metaphase						
Experiment 1	5,4	6,2	12,8	6,4	8,2	9,8
Experiment 2	5,9	7,2	13,2	6,8	12,0	10,4
induzierte SCEs/Metaphase						
Experiment 1		0,8	7,4	1,0	2,8	4,4
Experiment 2		1,3	7,3	0,9	6,1	4,5

Tab. 11: Einfluß der Cumarinderivate + NUV auf die Induktion von SCEs in menschlichen Lymphocytenkulturen. Rohdaten aus 2 Experimenten.
(Bestrahlungsbedingungen: $8,5 \text{ Wm}^{-2}$, 5 min; Bestrahlungszeitpunkt: 24 h vor Kulturende)

Substanz eine auffallend unregelmäßige Wirksamkeit. Die jeweils im gleichen Ansatz durchgeführten Versuche mit den anderen Testverbindungen weisen dagegen sehr gute Übereinstimmung auf (Tab. 11).

Um einen Hinweis auf eine Wachstumsbeeinflussung durch die Behandlung mit den Cumarinderivaten in Kombination mit NUV zu erhalten, wurde bei allen Serien das Verhältnis von M1:M2:M3 ausgewertet (Tab. 12). Die Behandlung mit 8-MOP + NUV scheint eine leichte Verzögerung des Wachstums zu bewirken. Die Anzahl der ersten Metaphasen liegt immer über der der Kontrolle, ähnlich verhält es sich bei den mit 8-IOP + NUV behandelten Kulturen. 5,7-DMC zeigt eine der Kontrolle sehr ähnliche Verteilung der entsprechenden Metaphasen. Bei 5'-MA + NUV zeigt sich im ersten Versuch ein der Kontrolle nahezu identisches Muster, während im zweiten Versuch eine starke Abweichung ersichtlich ist; ein Vergleich mit den SCE-Raten ergibt, daß im ersten Versuch nur eine geringe Erhöhung der SCE-Rate zu verzeichnen ist, während im zweiten Versuch die Anzahl der SCEs deutlich erhöht ist.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen wurden zwei weitere Versuche durchgeführt, bei denen die Bestrahlung mit NUV erst 12 h vor Kulturende erfolgte. Die Lymphocyten stellen ein heterogenes Gemisch von verschiedenen schnell proliferierenden Zellen dar (Obe et al, 1975; Beek und Obe, 1979). Es gibt darunter Zellen mit einer sehr kurzen Zellzyklusdauer von weniger als 12 h, andererseits treten auch langsam wachsende Zellen auf, die mehr als 24 h für einen Zellzyklus brauchen. Um die Sensibilität der schnell wachsenden Lymphocyten zu testen und um festzustellen, ob sich ein Schaden, der zu SCEs führt, bereits nach einem Zellzyklus nach Behandlung äußern kann, wurde folgender Versuch angesetzt: 59 h nach Kulturansatz wurden die Testverbindungen

	Experiment 1			Experiment 2		
	M1	M2	M3	M1	M2	M3
Kontrolle	82	43	0	89	35	1
NUV	87	38	0	90	34	1
8-MOP + NUV	101	24	0	105	20	0
8-IOP + NUV	86	39	0	107	18	0
5'-MA + NUV	83	42	0	68	57	0
5,7-DMC + NUV	76	49	0	82	42	0

Tab. 12: Wachstumsbeeinflussung von menschlichen Lymphocyten durch Cumarinderivate +

NUV, dargestellt am Verhältnis entsprechend markierter Metaphasen.

M1 = erste Metaphasen, M2 = zweite Metaphasen, M3 = dritte Metaphasen.

Bei jedem Experiment wurden 125 Metaphasen ausgewertet.

(NUV-Bestrahlung: $8,5 \text{ Wm}^{-2}$, 5 min; Zeitpunkt: 24 h vor Kulturende)

zugegeben, 60 h nach Kulturansatz wurde wie üblich bestrahlt. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, daß die Metaphasen, die sich bei Fixierung nach 72 h als zweite Metaphasen darstellen, nach der Behandlung noch eine Zellzyklusphase durchlaufen haben, wurde BrdU erst nach 48 h zugegeben. Zellen, die nach 24stündiger Markierung mit BrdU differenziert erscheinen, müssen einen Zellzyklus in maximal 12 h durchlaufen.

Wie man Tab. 13 entnehmen kann, wird unter diesen Bedingungen in keinem Fall eine Erhöhung der SCE-Rate induziert.

	Anzahl der Experimente	Analysierte Metaphasen	SCEs/Metaphase + Standardabweichung
Kontrolle	2	50	5,70 ± 2,65
NUV	2	50	6,12 ± 2,91
8-MOP + NUV	2	50	6,76 ± 2,68
8-IOP + NUV	2	50	6,86 ± 3,28
5'-MA + NUV	2	50	6,02 ± 2,21
5,7-DMC + NUV	2	50	6,50 ± 2,67

Tab. 13: Einfluß der Cumarinderivate + NUV auf die SCE-Rate von menschlichen Lymphocyten bei NUV-Bestrahlung 12 h vor Kulturende.
(Bestrahlungsbedingungen: 8,5 Wm⁻², 5 min)

3.4. Diskussion der Ergebnisse im Lymphocytensystem

3.4.1. Dunkelversuche mit den Cumarinderivaten

Die SCE-Analyse gilt als äußerst sensitives System zur Erfassung von DNA-Schäden (Kato, 1974; Perry und Evans, 1975; Solomon und Bobrow, 1975; Stetka und Wolff, 1976; Sasaki, 1977; Carrano et al, 1978; Renner, 1979; Nakanishi und Schneider, 1979). SCEs können direkt als Folge von DNA-Diskontinuitäten oder indirekt als Ergebnis von enzymatischen Wirkungen entstehen. Der molekulare Wirkungsmechanismus ist jedoch bis jetzt nicht geklärt (Evans, 1977; Stetka, 1979; Painter, 1980; Übersichtsartikel: Wolff, 1977; Galloway, 1977; Latt, 1979).

8-MOP interkaliert ohne Belichtung zwischen die DNA-Basen (Dall'Acqua et al, 1966). Dadurch können Veränderungen in der Sekundärstruktur der DNA-Helix verursacht werden, die möglicherweise eine Hemmung oder Inaktivierung von Enzymen bedingen, die an der Replikation beteiligt sind.

Die vorliegenden Daten zeigen erstmals eindeutig, daß 8-MOP auch ohne Belichtung fähig ist, SCEs zu induzieren. Die Wirkungsstärke ist bescheiden, verglichen mit den Werten, die in Verbindung mit NUV erhalten werden. Die Zunahme ist aber reproduzierbar. In den bisher erschienenen Arbeiten wurde in den Dunkelkontrollen mit 8-MOP keine SCE-Erhöhung nachgewiesen. In diesen Experimenten war die Behandlungszeit, sofern überhaupt angegeben, sehr kurz (Tab. 14). Die kurze Zeit genügte, um den Photoeffekt sichtbar zu machen. Um jedoch die Dunkelwirkung zu erkennen, sind offenbar wesentlich längere Einwirkungszeiten erforderlich. Ähnliche Probleme traten beim Nachweis der mutagenen Wirksamkeit von 8-MOP im Dunkel bei Bakterien auf: nur bei geeigneten Be-

Untersucher	Konzentration	Behandlungszeit	Zelltyp
Carter et al, 1976	1,1 µg/ml	nicht angegeben	Lymphocyten
Mourelatos et al 1977	40 µg/ml	nicht angegeben	Lymphocyten
Waksvik et al 1977	50 µg/ml	2 h	Lymphocyten
Latt und Loveday 1978	1,1-11 µg/ml	nicht angegeben	Chinesische Hamster Ovar Zellen
Burger und Simons 1979	50 µg/ml	4 h	V 79 Chinesische Hamster Zellen

Tab. 14: Versuchsbedingungen für die Abklärung einer Wirkung von 8-MOP im Dunkel
aus verschiedenen Publikationen

dingungen, nämlich bei relativ hohen Konzentrationen, ließen sich frameshift-Mutanten nachweisen, bei geringeren Konzentrationen war das Ergebnis negativ (Bridges und Mottershead, 1977).

Überraschenderweise erweist sich die dem 8-MOP strukturell nahe verwandte Verbindung 8-IOP eindeutig als unfähig, unter denselben Bedingungen wie 8-MOP SCEs zu induzieren. Man könnte zunächst vermuten, daß die geringere Löslichkeit von 8-IOP oder die räumliche Struktur eine Rolle spielen. Durch die lange Seitenkette ist die Interkalationskomplexbildung vermutlich behindert und die Reaktion mit der DNA läuft verlangsamt ab. Die Substanz braucht bereits entsprechend länger, um in die Zelle zu gelangen. Dagegen spricht jedoch, daß die Einwirkung von 8-IOP unter denselben Bedingungen eine vergleichbar hohe Bruchrate liefert wie 8-MOP. Dies stimmt überein mit der Tatsache, daß ein dem 8-MOP vergleichbar hoher Sättigungswert für die induzierten Revertanten im Algentestsystem durch 8-IOP erreicht werden kann, wenn man die Bestrahlungszeit entsprechend verlängert. Möglicherweise wird bei den Dunkelversuchen durch die relativ lange Behandlungszeit von 24 h der Zeiteffekt eliminiert, so daß die langsamere Wirkungsgeschwindigkeit von 8-IOP nicht ins Gewicht fällt. Eine Übereinstimmung der beiden getesteten linearen Verbindungen zeigt sich auch bei der Beeinflussung der Lymphocytenproliferation: von beiden Derivaten wird prinzipiell das gleiche Verteilungsmuster der entsprechenden Metaphasen bewirkt.

5'-MA, unser Vertreter der angularen Derivate, weist im Vergleich zu den linearen Furocumarinen ein grundsätzlich anderes Verhalten auf, sowohl bezüglich der Wachstumsbeeinflussung als auch bezüglich der SCE-Induktion. Es liefert als einziges der geprüften Agenzien im SCE-Test keine

reproduzierbaren Ergebnisse. Eine unregelmäßige schwache mutagene Wirksamkeit dieses Derivats tritt auch im Algen-testsystem auf; ihre Ursache ist noch unklar.

Während die getesteten Furocumarine alle einen Einfluß auf das Lymphocytenwachstum ausüben, verändert die Anwesenheit von 5,7-DMC die Proliferation im Vergleich zur Kontrolle nicht. Dagegen wird die SCE-Rate durch das einfache Cumarin leicht erhöht.

Die Ergebnisse legen nahe, daß die Beeinflussung der Lymphocytenproliferation und der SCE-Rate auf verschiedenen Ursachen beruhen. Den chromosomalen Aberrationen und SCEs ist gemeinsam, daß sie nur durch eine Reaktion mit der DNA entstehen. Die Schäden, die für beide Typen cytogenetischer Wirkung verantwortlich sind, könnten jedoch von verschiedener Art sein (Kato, 1977; Ikushima, 1977; Sono und Sakaguchi, 1978; Schubert und Meister, 1979). Darauf weisen die dargestellten Ergebnisse ebenfalls hin. Bei der SCE-Induktion könnten sich Faktoren wie Reparaturmechanismen auf das Ergebnis auswirken (Bender et al, 1974; Kato, 1974; Sasaki, 1977; Pant und Kamada, 1978). Daten über Reparaturvorgänge nach Behandlung mit den einzelnen Verbindungen liegen jedoch bisher nur vom 8-MOP vor.

Die Struktur der geprüften Verbindungen beeinflusst die Wirkungsstärke, doch läßt sich aus der Zugehörigkeit zur mono- oder bifunktionalen Gruppe allein die tatsächliche Wirkung nicht sicher abschätzen. Die Wirkung beruht vermutlich auf mehreren Ursachen: neben der Bildung eines Interkalationskomplexes mit der DNA sind auch feste Bindungen mit bestimmten Proteinen nachgewiesen (Meffert et al, 1976). Während man bei Effekten wie Zellteilungshemmung bei Algen (Schimmer und Hauber, 1977) und Wachstumsbeeinflussung bei Lymphocyten durch Furocumarine im Dunkel eine Reaktion mit Proteinen

diskutieren könnte, sollten SCEs und Chromosomenaberrationen wohl eher durch eine Interkalation mit der DNA zustandekommen. Inwieweit allerdings eine Hemmung von Stoffwechselprozessen oder Membranveränderungen, bedingt durch die Proteinreaktion, indirekt die Entstehung von SCEs und Chromosomenaberrationen beeinflussen, ist noch nicht geklärt.

Als wichtiges Ergebnis läßt sich feststellen, daß Furocumarine im Dunkel merkliche Aktivität besitzen. Die mutagenen Potenzen und damit in Zusammenhang stehende Phänomene der Verbindungen per se sind zwar schwach und erfordern relativ hohe Konzentrationen. Vor allem für die Langzeitbehandlung mit 8-MOP ist bei einer eventuellen Kumulierung eine Nebenwirkung der Photochemotherapie auf andere Organe als die Haut nicht auszuschließen.

3.4.2. Wirkung der Cumarinderivate in Verbindung mit NUV

Die Induktion von SCEs durch die Referenzsubstanz 8-MOP in Verbindung mit NUV wurde in den letzten Jahren von mehreren Autoren untersucht (Carter et al, 1976; Mourelatos et al, 1977; Waksvik et al, 1977; Wolff-Schreiner et al, 1977; Brøgger et al, 1978; Gaynor et al, 1978). Die Ergebnisse dieser Lymphocytenarbeiten zeigen eine relativ breite Streuung bezogen auf die Anzahl der induzierten SCEs/Metaphase; diese Abweichungen sind sicher teilweise auf unterschiedliche Behandlungsbedingungen zurückführbar. Daneben könnte eine eventuelle Bindung von 8-MOP an Serumproteine (Veronese et al, 1978; Artuc et al, 1979) den Effekt zusätzlich beeinflussen; die einzelnen Untersucher verwenden verschiedene Serumkonzentrationen in ihren Ansätzen, dadurch könnte die Streubreite unter Umständen noch

vergrößert werden. Unter Berücksichtigung etwa vergleichbarer Dosen entsprechen die dargestellten Ergebnisse den bisher bekannten.

8-MOP zeigt auch in Kombination mit NUV die stärkste Wirkung der geprüften Furocumarinderivate auf die SCE-Rate. Nach Latt (zitiert nach: Wolff und Carrano, 1979) führt nur ein geringer Teil der Schäden an der DNA zu SCEs; in seinen Experimenten mit 8-MOP + NUV an Chinesischen Hamsterzellen sind 195 Bindungsstellen von 8-MOP an der DNA nötig, um einen SCE zu induzieren. Eine notwendige Beteiligung von cross-links an der SCE-Entstehung ist noch nicht gesichert. Unsere Ergebnisse weisen eher darauf hin, wie die von Carrano et al (1979), daß cross-links nicht als notwendige Voraussetzung für SCEs zu sehen sind. Auch 5,7-DMC und 5'-MA als monofunktionale Derivate können eine Erhöhung der SCE-Rate bewirken. Allerdings ist die Erhöhung der SCE-Rate durch zur cross-link Bildung fähige Verbindungen in der Regel wesentlich stärker (Carrano et al, 1979). 8-IOP übt als einziges der geprüften Agenzien keinen Einfluß auf die SCE-Frequenz aus, auch nicht in Verbindung mit NUV. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß das negative Ergebnis im Fall der gleichzeitigen Bestrahlung mit NUV auf die langsame Reaktionsgeschwindigkeit zurückzuführen ist. Aufgrund dieses rein qualitativen Vergleichs der Cumarinderivate ohne Aufstellen von Dosis-Effekt-Kurven für jede einzelne Substanz erweist sich eine Interpretation der SCE-Ergebnisse für sich als problematisch.

Das negative Resultat der mutagenen Behandlung 12 h vor Kulturende kann auf eine unterschiedliche Sensitivität der schnell bzw. langsam proliferierenden Zellen zurückzuführen sein. Es könnte jedoch auch mit als Folge einer ungleichmäßigen Schädigung der Zellen zu sehen sein (Suspension!),

die sich aufgrund der nur kurzen Zeit bis zur Fixierung besonders stark auswirkt. Nicht geschädigte Zellen könnten innerhalb von 12 h noch in die Mitose eintreten, während man bei geschädigten Zellen eine selektive Wachstumshemmung annehmen kann. Dafür spricht besonders im Fall von 8-MOP die Auswertung der entsprechend markierten Metaphasen: es zeigt sich eindeutig eine wachstumshemmende Wirkung. Zudem ist bekannt, daß Schäden, die zu SCEs führen, lang anhalten: Auch im zweiten und dritten Zellzyklus nach Agenseinwirkung können noch zusätzliche SCEs entstehen (Ishii und Bender, 1978). Somit dürfte man in späteren Zellzyklen nach Behandlung von vorneherein mehr Austausche erwarten. Auch ein Ergebnis von Latt und Loveday (1978) in Zusammenhang mit Zellzyklusphasen ist zu bedenken: Die SCE-Induktion durch 8-MOP + NUV ist bei Chinesischen Hamsterzellen zu Beginn der S-Phase am größten, fällt dann langsam ab und ist gleich Null, bevor die letzten 10 bis 20 % der S-Phase völlig abgelaufen sind.

4. Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse aus beiden Testsystemen

Im Dunkel zeigt 8-MOP nur an menschlichen Lymphocyten genetische Aktivität: es bewirkt an den Lymphocytenchromosomen eine Erhöhung der SCE-Rate sowie der Chromosomenaberrationen. Von der Wirkungsstärke her kann es als schwach clastogenes Agens eingestuft werden. Im Algensystem hatte sich keine Mutationsinduktion im Dunkel beobachten lassen (Schimmer und Hauber, 1977).

Im NUV erweist sich 8-MOP als das am stärksten wirksame Cumarinderivat in beiden verwendeten Testsystemen. Neben der starken toxischen Wirkung und mutagenen Potenz in Chlamydomonas besitzt 8-MOP deutlich eine Fähigkeit zur Induktion von SCEs im Lymphocytensystem.

Die Dunkelwirkung von 8-IOP wurde an Lymphocyten bezüglich zweier Parameter untersucht: beim SCE-Test erhält man ein negatives Ergebnis, dagegen treten bei der Prüfung auf Chromosomenaberrationen dem 8-MOP entsprechende Werte an induzierten Chromosomenbrüchen auf. Die schwache clastogene Wirkung von 8-IOP ist nicht korreliert mit einer Erhöhung der SCE-Rate.

In Kombination mit NUV wirkt 8-IOP prinzipiell wie 8-MOP im Algensystem, nur stark verlangsamt. Unter gleichen Bedingungen tritt daher immer ein wesentlich schwächerer Einfluß auf, unter optimalen Bedingungen sind die beiden linearen Derivate von ihrer toxischen und mutagenen Potenz her jedoch durchaus vergleichbar. Beim SCE-Test erhält man dagegen auch in Verbindung mit NUV unter den geprüften Bedingungen ein negatives Ergebnis mit 8-IOP. Die fehlen-

de Induktion von SCEs durch 8-IOP könnte durchaus in den Behandlungsbedingungen begründet sein, insofern, als die Bestrahlungszeit für eine merkliche Reaktion von 8-IOP einfach zu kurz war. Es fällt auf, daß in der Literatur 8-IOP als Agens beschrieben wird, das die Haut nicht photosensibilisiert (Musajo et al, 1965). Aus der Darstellung der Untersuchungen von Musajo kann man schließen, daß der Test auf Hautphotosensibilisierung für alle Furocumarine unter gleichen Bedingungen vorgenommen wurde. Aufgrund der Ergebnisse im Algensystem liegt die Vermutung nahe, daß man bei fehlender Berücksichtigung der langsamen Reaktionsweise unter Umständen falsch negative Ergebnisse für 8-IOP erhalten könnte.

Im Dunkel ist ein Einfluß des angularen Derivats 5'-MA auf die SCE-Rate an menschlichen Lymphocytenchromosomen nicht sicher nachweisbar; es tritt eine unregelmäßige, äußerst schwache Wirkung auf.

Im NUV bringt 5'-MA übereinstimmende Ergebnisse in beiden Testsystemen bezüglich der schwachen Mutagenität in Chlamydomonas und der schwachen Potenz zur Induktion von SCEs in Lymphocyten. Die unregelmäßige Wirkung sowohl im Algensystem als auch in Lymphocyten - hier im NUV wie im Dunkel - zeigt, daß dieses Phänomen nicht durch objektspezifische Eigenheiten bedingt ist, sondern in irgendeiner Weise mit der Wirkungsweise der Substanz an sich zusammenhängen muß. Die reproduzierbare starke Toxizität in Chlamydomonas bestätigt die Aussagen anderer Untersucher (Bradley et al, 1979; Peterson, 1980; Raffetto et al, 1980), daß Mutagenität und SCE-Induktion nicht notwendigerweise mit der Toxizität einer Verbindung korreliert sind.

Im Dunkel zeigt 5,7-DMC eine geringe Fähigkeit zur SCE-Induktion im Lymphocytensystem, ebenso in Verbindung mit

NUV unter den gegebenen Bedingungen. Dieser schwache Einfluß auf die SCE-Rate ist jedoch weder mit einer merklichen Erhöhung der Mutationsrate noch mit einer Erniedrigung der Überlebensrate in *Chlamydomonas* gekoppelt. Ein ähnliches Verhalten beschreiben Bradley et al (1979) für Wasserstoffperoxid. Da die Wirkung von 5,7-DMC im SCE-Test als sehr schwach einzustufen ist, kann dieses Ergebnis nicht als wesentliche Abweichung von den Werten des Algensystems betrachtet werden. Es bestärkt eher die Annahme, daß dieses einfache Cumarin nicht direkt den Furocumarinen von seiner Wirkungsweise her zuzuordnen ist, obwohl es auch eine Reaktion mit der DNA eingeht (Ou et al, 1978).

Die vergleichenden Untersuchungen sind als eine Art Vor-screening zu betrachten, bei dem Verbindungen herausgefiltert werden sollen, die in der Therapie möglichst geringe unerwünschte Langzeitwirkungen erwarten lassen. Unsere Ergebnisse legen nahe, die monofunktionalen Furocumarinderivate auf ihre therapeutische Wirksamkeit zu prüfen. Dies ist für 3-Carbethoxypsoralen schon geschehen und brachte positive Resultate (Dubertret et al, 1978).

Während man aber Befunde kennt, die darauf hinweisen, daß bifunktionale Furocumarine cancerogene Potenz besitzen (Griffin et al, 1958; Hakim et al, 1960; Grube et al, 1977; Stern et al, 1979), gibt es für monofunktionale Derivate noch keine umfassenden Untersuchungen auf Cancerogenität. Wenn die cancerogene Potenz mit der mutagenen korreliert ist, sollten nach unseren Ergebnissen monofunktionale Furocumarine ein geringeres Risiko darstellen. Da die therapeutische Aktivität offenbar nicht oder nicht ausschließlich vom bifunktionalen Charakter abhängt, könnte das Verhältnis von Nutzen zu Risiko für monofunktionale Verbindungen günstiger sein.

5. Zusammenfassung

1. In Verbindung mit NUV sind die Ergebnisse in beiden verwendeten Testsystemen qualitativ und quantitativ vergleichbar:
 - 8-MOP ist jeweils die Substanz mit der stärksten Aktivität. Dies trifft zu für alle geprüften Parameter: Toxizität, Mutagenität und SCE-Induktion.
 - 8-IOP wirkt langsamer als 8-MOP, die Potenz hängt von der Behandlungsdauer ab. Im Algensystem zeigt 8-IOP prinzipiell die gleiche Wirkungsweise wie 8-MOP, die Reaktionsgeschwindigkeit ist jedoch stark verlangsamt. Unter optimalen Bedingungen tritt dem 8-MOP vergleichbar starker Einfluß auf die Induktion von Revertanten und auf die Inaktivierungsrate auf, bei gleichen Bedingungen hat 8-IOP einen wesentlich schwächeren Effekt. Die fehlende Induktion von SCEs dürfte auf die zu kurze Behandlungszeit zurückzuführen sein.
 - 5'-MA wirkt schwach und unregelmäßig in beiden Systemen bezüglich der SCE-Induktion bzw. der Mutationsinduktion. Die Toxizität von 5'-MA im Algensystem ist sehr stark und durchaus der von 8-MOP vergleichbar.
 - 5,7-DMC zeigt eine schwache Wirkung im SCE-Test an Lymphocyten und im getesteten Bereich keine sichere mutagene und toxische Wirkung in Chlamydomonas. Es kann von seiner Wirkungsweise her nicht den Furocumarinen zugeordnet werden.
2. Die Ergebnisse im Algentestsystem zeigen, daß der mutagene Effekt der linearen Furocumarinderivate sowohl von der Substanzkonzentration wie auch von der NUV-Dosis abhängig ist. Die NUV-Dosis übt allerdings den entscheidenden Einfluß aus. Im Gegensatz dazu scheint die Muta-

genität des angularen 5'-MA nur in sehr geringem Maß - wenn überhaupt - von der NUV-Dosis abzuhängen; eine Abhängigkeit von der Substanzkonzentration ist jedoch auch bei 5'-MA gegeben.

3. Toxizität und Mutagenität laufen nicht notwendigerweise parallel, ebensowenig SCE-Induktion und clastogene Wirkung. Im Algensystem ist eine starke Mutagenität an bifunktionale Furocumarine gebunden, bezüglich der Toxizität ist eine solche Zuordnung nicht möglich. Zusammenfassend ergibt sich, daß nur bifunktionale Derivate eine starke genetische Wirkung erwarten lassen.
4. Im Dunkel zeigen die Cumarinderivate nur in Lymphocyten positive Effekte. Von dem in diesem System am stärksten wirksamen 8-MOP kann in Chlamydomonas keine mutagene Aktivität im Dunkel nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse machen deutlich, daß sich die genetische Aktivität von Substanzen allein aus einer Prüfung am Testsystem Chlamydomonas nicht immer sicher erkennen läßt. Eine zusätzliche Einbeziehung des Lymphocytentestsystems ist somit als sinnvolle Ergänzung weiterer Untersuchungen angebracht.

6. Literaturverzeichnis

Alterburg, E. (1956):

Studies on the enhancement of the mutationrate by carcinogens.

Texas Rep. Biol. Med. 14, 481

Artuc, M., Stuetzgen, G., Schalla, W., Schaefer, H., Gazith, J. (1979):

Reversible binding of 5-methoxypsoralen and 8-methoxypsoralen to human serum proteins (albumin) and to epidermis in vitro.

Brit. J. Dermatol. 101, 669-677

Ashwood-Smith, M. J., Grant, E. (1977):

Conversion of psoralen DNA monoadducts in E. coli to inter-strand DNA cross links by near UV light (320-360 nm): Inability of angelicin to form cross links, in vivo.

Experientia 33, 384-386

Ashwood-Smith, M. J. (1978):

Frameshift mutations in bacteria produced in the dark by several furocoumarins; Absence of activity of 4.5',8-trimethylpsoralen.

Mutat. Res. 58, 23-27

Auerbach, A. (1976):

Mutation Research: Problems, Results and Perspectives.
Chapman and Hall, John Wiley, New York

Averbeck, D., Moustacchi, E. (1975):

8-Methoxypsoralen plus 365 nm light effects and repair in yeast.

Biochim. Biophys. Acta 395, 393-404

Averbeck, D., Averbeck, S. (1978):

Dose-rate effects of 8-methoxypsoralen plus 365 nm-irradiation on cell killing in *Saccharomyces cerevisiae*.

Mutat. Res. 50, 195-206

Averbeck, D., Moustacchi E., Bisagni, E. (1978):

Biological effects and repair of damage photoinduced by a derivative of psoralen substituted at the 3,4 reaction site. Photoreactivity of this compound and lethal effect in yeast.

Biochim. Biophys. Acta 518, 464-481

Averbeck, D., Moustacchi, E. (1979):

Genetic effects of 3-carbethoxypsoralen, angelicin, psoralen and 8-methoxypsoralen plus 365 nm-irradiation in *Saccharomyces cerevisiae*. Induction of reversions, mitotic crossing-over, gene conversion and cytoplasmic "petite" mutations.

Mutat. Res. 68, 133-148

Averbeck, D., Bisagni, E., Marquet, J. P., Vigny, P., Gaboriau, F. (1979):

Photobiological activity in yeast of derivatives of psoralen substituted at the 3,4 and/or the 4',5' reaction site.

Photochem. Photobiol. 30, 547-555

Averbeck, D., Moustacchi, E. (1980):

Decreased photoinduced mutagenicity of mono-functional as opposed to bi-functional furocoumarins in yeast.

Photochem. Photobiol. 31, 475-478

Bacchichetti, F., Bordin, F., Carllassare, F., Guiotto, A. (1979):

T₂ phage sensitization by linear and angular furocoumarins.
Z. Naturforsch. 34c, 811-814

Beek, E., Obe, G. (1975):

The human leukocyte test system VI. The use of sister chromatid exchanges as possible indicators for mutagenic activities.

Hum. Genet. 29, 127-134

Beek, B., Obe, G. (1979):

Sister chromatid exchanges in human leukocyte chromosomes: Spontaneous and induced frequencies in early- and late-proliferating cells in vitro.

Hum. Genet. 49, 51-61

Bender, M. A., Griggs, H. G., Bedford, J. S. (1974):

Recombinational DNA repair and sister chromatid exchanges.

Mutat. Res. 24, 117-123

Ben-Hur, E., Prager, A., Riklis, E. (1979):

Measurement of DNA crosslinks by S₁ nuclease: Induction and repair in psoralen-plus-360 nm light treated Escherichia coli.

Photochem. Photobiol. 29, 921-924

Bensasson, R. V., Land, E. J., Salet, C. (1978):

Triplet excited state of furocoumarins: Reaction with nucleic acid bases and amino acids.

Photochem. Photobiol. 27, 273-280

Bordin, F., Carlassare, F., Bacchichetti, F., Guiotto, A., Rodighiero, P., Vedaldi, D., Dall'Acqua, F. (1979a):

4,5'-Dimethylangelicin: A new DNA-photobinding monofunctional agent.

Photochem. Photobiol. 29, 1063-1070

Bordin, F., Carllassare, F., Bacchichetti, F., Guiotto, A.,
Rodighiero, P. (1979b):

5-Methylangelicin - new highly photosensitizing angular
furocoumarin.

Experientia 35, 1567-1568

Bradley, M. O., Hsu, I. C., Harris, C. C. (1979):

Relationships between sister chromatid exchange and muta-
genicity, toxicity and DNA damage.

Nature 282, 318-320

Bridges, B. A., Mottershead, R. P. (1977):

Frameshift mutagenesis in bacteria by 8-methoxypsoralen
(methoxalen) in the dark.

Mutat. Res. 44, 305-312

Brøgger, A., Waksvik, H., Thune, P. (1978):

Psoralen/UVA treatment and chromosomes.

Arch. Dermatol. Res. 261, 287-294

Burger, P. M., Simons, J. W. (1978):

Mutagenicity and carcinogenicity of 8-MOP/UVA in cell cultures.

Bull. Cancer 65, 281-282

Burger, P. M., Simons, J. W. (1979):

Mutagenicity of 8-methoxypsoralen and long-wave ultraviolet
irradiation in diploid human skin fibroblasts. An improved
risk estimate in photochemotherapy.

Mutat. Res. 63, 371-380

Cannistraro, S., van de Vorst, A. (1978):

ESR and optical absorption evidence for free radical involvement in the photosensitizing action of furocoumarin derivatives and for their singlet oxygen production.

Biochim. Biophys. Acta 476, 106-177

Carrano, A. V., Thompson, L. H., Lindl, P. A., Minkler, J. M. (1978):

Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. Nature 271, 551-553

Carrano, A. V., Thompson, L. H., Stetka, D. G., Minkler, J. M., Mazrimas, J. A., Fong, S. (1979):

DNA crosslinking, sister-chromatid exchange and specific-locus mutations.

Mutat. Res. 63, 175-188

Carter, D. M., Wolff, K., Schnedl, W. (1976):

8-Methoxypsoralen and UVA promote sister-chromatid exchanges. J. Invest. Dermatol. 67, 548-551

Chandra, P., Biswas, R. K., Dall'Acqua, F., Marciani, S. Bacchichetti, F., Vedaldi, D., Rodighiero, G. (1973):

Post-irradiation dark recovery of photodamage to DNA induced by furocoumarins.

Biophysik 9, 113-119

Clarke, C. H., Wade, M. J. (1975):

Evidence that caffeine, 8-methoxypsoralen and steroidal diamines are frameshift mutagens for E. coli K-12.

Mutat. Res. 28, 123-125

Cole, R. S. (1973):

Repair of DNA containing interstrand crosslinks in Escheri-

chia coli: Sequential excision and recombination.

Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 70, 1064-1068

Cole, R. S., Sinden, R. R. (1974):

Psoralen cross-links in DNA: Biological consequences and cellular repair.

Radiat. Res. 59, 243-253

Coppey, J., Averbek, D., Moreno, G. (1979):

Herpes virus production in monkey kidney and human skin cells treated with angelicin or 8-methoxypsoralen plus 365 nm light.

Photochem. Photobiol. 29, 797-801

Dall'Acqua, F., Rodighiero, G. (1966):

The dark-interaction between furocoumarins and nucleic acids.

Lincei. Rend. Sc. fis. mat. e nat. 40, 411-422

Dall'Acqua, F., Marciani, S., Ciavatta, L., Rodighiero, G. (1971):

Formation of inter-strand cross-linkings in the photoreactions between furocoumarins and DNA.

Z. Naturforsch. 26b, 561-569

Dall'Acqua, F., Marciani, S., Vedaldi, D., Rodighiero, G. (1974a):

Studies on the photoreactions (365 nm) between DNA and some methylpsoralens.

Biochim. Biophys. Acta 353, 267-273

Dall'Acqua, F., Marciani, S., Vedaldi, D., Rodighiero, G. (1974b):

Skin photosensitization and cross-linkings formation in

native DNA by furocoumarins.

Z. Naturforsch. 29c, 635-636

Dall'Acqua, F., Vedaldi, D., Recher, M. (1978a):

The photoreaction between furocoumarins and various DNA with different base compositions.

Photochem. Photobiol. 27, 33-36

Dall'Acqua, F., Caffieri, S., Rodighiero, G. (1978b):

Fluorometric determination of 4',5'-cycloadducts in the DNA-psoralen photoreaction.

Photochem. Photobiol. 27, 77-79

Dall'Acqua, F., Terbojevich, M., Marciani, S., Vedaldi, D., Recher, M. (1978c):

Investigation on the dark interaction between furocoumarins and DNA.

Chem.-Biol. Inter. 21, 103-115

Dall'Acqua, F., Marciani, S., Zamban, F., Rodighiero, G. (1979):

Kinetic analysis of the photoreaction (365 nm) between psoralen and DNA.

Photochem. Photobiol. 29, 489-495

Dietz, U. (1980):

Untersuchungen zur toxischen und mutagenen Wirkung von Angelicin in Verbindung mit NUV oder Weißlicht an Chlamydomonas reinhardtii.

Zulassungsarbeit, Erlangen

Dubertret, L., Averbek, D., Zajdela, F., Bisagni, E., Mustacchi, E., Tournai, R., Latarjet, R. (1979):

Photochemotherapy (PUVA) of psoriasis using 3-carbethoxy-psoralen, a non-carcinogenic compound in mice.

Brit. J. Dermatol. 101, 379-389

Evans, H. J. (1977):

What are sister chromatid exchanges?

In: Chromosomes today, Vol. 6, 315-326, de la Chapelle, A., Sorsa, M., Hrsg.

Elsevier, Amsterdam

Galloway, S. (1977):

What are sister chromatid exchanges?

In: DNA Repair Processes, 191-201, Aronson, M. M., Jacobs, L. J., Miller, R. C., Toji, L. H., Hrsg.

Symposia Specialists Inc., Miami

Gaynor, A. L., Carter, D. M. (1978):

Greater promotion in sister chromatid exchanges by trimethyl-psoralen than by 8-methoxypsoralen in the presence of UV-light.

J. Invest. Dermatol. 71, 257-259

Gebhart, E. (1970):

The treatment of human chromosomes in vitro: Results.

In: Chemical Mutagenesis in Mammals and Man, 367-382, Vogel, F., Röhrborn, G., Hrsg.

Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Grant, E. L., van Borstel, R. C., Ashwood-Smith, M. J. (1979):

Mutagenicity of cross-links and monoadducts of furocoumarins (psoralen and angelicin) induced by 360 nm radiation in excision-repair-defective and radiation-insensitive strains of *Saccharomyces cerevisiae*.

Environ. Mutagen. 1, 55-63

Griffin, H. C., Hakim, P. E., Knox, J. (1958):

The wavelength effect upon erythema and carcinogenic response in psoralen treated mice.

J. Invest. Dermatol. 31, 289-295

Grube, D. D., Ley, R. D., Fry, R. J. M. (1977):

Photosensitizing effects of 8-methoxypsoralen on the skin of hairless mice - II Strain and spectral difference for tumorigenesis.

Photochem. Photobiol. 25, 269-276

Gutter, B., Speck, W. T., Rosenkranz, H. S. (1977):

A study of the photoinduced mutagenicity of methylene blue.

Mutat. Res. 44, 177-182

Hakim, R. E., Griffin, A. C., Knox, J. M. (1960):

Erythema and tumor formation in methoxsalen-treated mice exposed to fluorescent light.

Arch. Dermatol. 82, 572-578

Harter, M. L., Felkner, J. C., Song, P.-S. (1976):

Near-UV effects of 5,7-dimethoxycoumarin in *Bacillus subtilis*.

Photochem. Photobiol. 24, 491-493

Hartmann, K. M. (1978):

Aktionsspektrometrie

In: Biophysik, 197-222, Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H., Hrsg.

Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Igali, S., Gazso, L. (1971):

Photosensitizing lethal and mutagenic action of 8-methoxypsoralen and near ultraviolet light in *Escherichia coli*.

Stud. Biophys. 29, 45-52

Ikushima, T. (1977):

Role of sister chromatid exchanges in chromatid aberration formation.

Nature 268, 235-236

Ishii, Y., Bender, M. (1978):

Factors influencing the frequency of mitomycin-C-induced sister-chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine-substituted human lymphocytes in culture.

Mutat. Res. 51, 411-418

Kato, H. (1974):

Induction of sister chromatid exchanges by chemical mutagens and its possible relevance to DNA repair.

Exp. Cell Res. 85, 239-247

Kato, H., Shimada, H. (1975):

Sister chromatid exchanges induced by mitomycin C: A new method of detecting DNA damage at the chromosomal level.

Mutat. Res. 28, 459-464

Kato, H. (1977):

Mechanisms for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations.

Chromosoma 59, 179-197

Krauch, C. H., Krämer, D. M., Wacker, A. (1967):

Zum Wirkungsmechanismus photodynamischer Furocumarine.

Photochem. Photobiol. 6, 341-354

Krauch, C. H., Farid, S. (1967):

Photo-Cycloadditionen mit Furocumarinen und Furochromonen.

Chem. Ber. 100, 1685-1695

Latt, S. A., Loveday, K. S. (1978):

Characterization of sister chromatid exchange induction by 8-methoxypsoralen plus near UV light.

Cytogenet. Cell Genet. 21, 184-200

Latt, S. A. (1979):

Sister chromatid exchanges.

Genetics 92, 83-95

Lischka, G., Decker, E. (1978):

Dark effect of 8-methoxypsoralen (8-MOP) on lymphocytes.

Arch. Dermatol. Res. 261, 267-272

Lischka, G. (1979):

Lymphocyte proliferation during PUVA therapy.

Arch. Dermatol. Res. 265, 213-218

Loppes, R. (1969):

Effect of the selective medium on the manifestation of mutations induced with mono-alkylating agents in *Chlamydomonas reinhardi*.

Mutat. Res. 7, 25-34

Loppes, R., Matagne, R., Strijkert, P. J. (1972):

Complementation at the Arg-7 locus in *Chlamydomonas reinhardi*.

Heredity 28, 239-251

Lown, J. W., Sim, S. K. (1978):

Photoreaction of psoralen and other furocoumarins with nucleic acids.

Bioorg. Chem. 7, 85-95

Mathews, M. M. (1963):

Comparative study of lethal photosensitization of *Sarcina lutea* by 8-methoxypsoralen and by toluidine blue.

J. Bacteriol. 85, 322-328

Meffert, H., Diezel, W., Günther, W., Sönnichsen, N. (1976):
Fototherapie der Psoriasis mit 8-Methoxypsoralen und UVA.

II. Bindung des Fotosensibilisators an Protein.

Dermatol. Mschr. 162, 887-892

de Mol, N. J., Beijersbergen van Henegouwen, G. M. J. (1979):
Formation of singlet molecular oxygen by 8-methoxypsoralen.

Photochem. Photobiol. 30, 331-335

Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battips, D. M., Hungerford, D. A. (1960):
Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.

Exp. Cell Res. 20, 613-616

Mourelatos, D., Faed, M. J. W., Gould, P. W., Johnson, B. E., Frain-Bell, W. (1977):

Sister chromatid exchanges in lymphocytes of psoriatics after treatment with 8-methoxypsoralen and long wave ultra-violet radiation.

Brit. J. Dermatol. 97, 649-655

Musajo, L., Rodighiero, G. (1962):

The skin-photosensitizing furocoumarins.

Experientia 18, 153-161

Musajo, L., Rodighiero, G., Dall'Acqua, F. (1965):

Evidences of a photoreaction of the photosensitizing furocoumarins with DNA and with pyrimidine nucleosides and nucleotides.

Experientia 21, 24-26

Musajo, L., Bordin, F., Caporale, G., Marciani, S., Rigatti, G. (1967a):

Photoreactions at 3655 Å between pyrimidine bases and skin-photosensitizing furocoumarins.

Photochem. Photobiol. 6, 711-719

Musajo, L., Bordin, F., Bevilacqua, R. (1967b):

Photoreactions at 3655 Å, linking the 3,4 double bond of furocoumarins with pyrimidine bases.

Photochem. Photobiol. 6, 927-931

Musajo, L., Rodighiero, G. (1970):

Studies on the photo-C₄-cyclo-addition reactions between skin-photosensitizing furocoumarins and nucleic acids.

Photochem. Photobiol. 11, 27-35

Nakanishi, Y., Schneider, E. L. (1979):

In vivo sister-chromatid exchange: A sensitive measure of DNA damage.

Mutat. Res. 60, 329-337

Niemann, E.-G. (1978):

Strahlenbiophysik.

In: Biophysik, 223-234, Hoppe, W., Lohmann, W., Markl, H., Ziegler, H., Hrsg.

Springer, Berlin, Heidelberg, New York

Obe, G., Beek, B., Dudin, G. (1975):

The human leukocyte test system V. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 3-day-cultures.

Hum. Genet. 28, 295-302

O'Neal, M. A., Griffin, A. C. (1957):

The effect of oxypsoraleen upon ultraviolet carcinogenesis
in albino mice.

Cancer Res. 17, 911-916

Ou, C. N., Song, P.-S., Harter, M. L., Felkner, I. C. (1976):

Spectroscopic properties and interactions of dimethoxycou-
marin with DNA.

Photochem. Photobiol. 24, 487-490

Ou, C. N., Tsai, C. H., Tapley, K. J., Song, P.-S. (1978):

Photobinding of 8-methoxypsoralen and 5,7-dimethoxycoumarin
to DNA and its effect on template activity.

Biochemistry 17, 1047-1053

Painter, R. B. (1980):

A replication model for sister-chromatid exchange.

Mutat. Res. 70, 337-341

Pant, G. S., Kamada, N. (1978):

Sister chromatid exchanges and their relevance to defective
DNA repair in Xeroderma pigmentosum cells.

Indian J. Exp. Biol. 16, 1194

Perry, P., Wolff, S. (1974):

New Giemsa method for the differential staining of sister
chromatids.

Nature 251, 156-158

Perry, P., Evans, H. J. (1975):

Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by
sister chromatid exchange.

Nature 258, 121-125

Peterson, A. R. (1980):

DNA synthesis, mutagenesis, DNA damage, and cytotoxicity
in cultured mammalian cells.

Cancer Res. 40, 682-688

Poppe, W., Grossweiner, L. I. (1975):

Photodynamic sensitization by 8-methoxypsoralen via the
singlet oxygen mechanism.

Photochem. Photobiol. 22, 217-219

Raffetto, G., Parodi, S., Faggin, P., Maconi, A. (1979):

Relationship between cytotoxicity and induction of sister-
chromatid exchanges in mouse foetal cells exposed to se-
veral doses of carcinogenic and non-carcinogenic chemicals.

Mutat. Res. 63, 335-343

Renner, H. W. (1979):

Assessment of the in vivo sister chromatid exchange (SCE)-
test using various cytostatics.

Arzneim.-Forsch. 29, 1871-1875

Rodighiero, G., Musajo, L., Dall'Acqua, F., Marciani, S.,
Caporale, G., Ciavatta, L. (1970):

Mechanism of skin photosensitization by furocoumarins.
Photoreactivity of various furocoumarins with native DNA
and with ribosomal RNA.

Biochim. Biophys. Acta 217, 40-49

Sasaki, M. S. (1977):

Sister chromatid exchange and chromatid interchange as
possible manifestation of different DNA repair processes.

Nature 269, 623-625

Schimmer, O. (1975):

Mutagenic effect of xanthotoxin (methoxsalen) in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.

Plant Sci. Lett. 5, 83-88

Schimmer, O. (1978):

Untersuchungen zur mutagenen Wirksamkeit von Cumarinderivaten in *Chlamydomonas* IV. Verstärkung der phototoxischen und photomutagenen Wirkung von Xanthotoxin und Visnagin plus NUV durch zusätzliche Dunkelperioden.

Mutat. Res. 52, 353-360

Schimmer, O., Hauber, G. (1977):

Untersuchungen zur mutagenen Wirksamkeit von Cumarinderivaten in *Chlamydomonas* I. Der Einfluß von Licht verschiedener Wellenlängenbereiche auf die Mutationsinduktion durch Xanthotoxin in einer argininbedürftigen Mutante.

Mutat. Res. 44, 21-31

Schubert, I., Meister, A. (1979):

Possible connections between the modes of origination of sister chromatid exchanges (SCEs) and chromatid aberrations.

Stud. Biophys. 76, 211-217

Scott, B. R., Pathak, M. A., Mohn, G. R. (1976):

Molecular and genetic basis of furocoumarin reactions.

Mutat. Res. 39, 29-74

Shim, S. C., Choi, K. Y., Song, P.-S. (1978):

Studies on the phototoxicity of coumarin derivatives I. Photocyclodimerization of 5,7-dimethoxycoumarin.

Photochem. Photobiol. 27, 25-31

Shim, S. C., Chae, K. H. (1979):

Photocycloaddition of 5,7-dimethoxycoumarin to thymine.

Photochem. Photobiol. 30, 349-353

Sinden, R. R., Cole, R. S. (1978):

Repair of cross-linked DNA and survival of *Escherichia coli* treated with psoralen and light: Effects of mutations influencing genetic recombination and DNA metabolism.

J. Bacteriol. 136, 538-543

Solomon, E., Bobrow, M. (1975):

Sister chromatid exchanges - a sensitive assay of agents damaging human chromosomes.

Mutat. Res. 30, 273-278

Song, P.-S., Tapley, K. J., Jr. (1979):

Photochemistry and photobiology of psoralens.

Photochem. Photobiol. 29, 1177-1197

Sono, A., Sakaguchi, K. (1978):

Induction of sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells by antitumor agents and its relation to chromosome aberrations.

Cell Struct. Funct. 3, 341-347

Stern, R. S., Thibodeau, L. A., Kleinerman, R. A. (1979):

Risk of cutaneous carcinoma in patients treated with oral methoxsalen photochemotherapy for psoriasis.

N. Engl. J. Med. 300, 809-813

Stetka, D. G., Wolff, S. (1976):

Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens II. In vitro test for com-

pounds requiring metabolic activation.

Mutat. Res. 41, 343-350

Stetka, D. G., Jr. (1979):

Further analysis of the replication bypass model for sister chromatid exchange.

Hum. Genet. 49, 63-69

Tjerneld, F., Norden, B., Ljunggren, B. (1979):

Interaction between DNA and 8-methoxypsoralen studied by linear dichroism.

Photochem. Photobiol. 29, 1115-1119

Vermel, E. M., Tsetlin, A. L. (1964):

On the antitumorous activity of some furocoumarins.

Vop. Onkologii 10, 85-90

Veronese, F. M., Bevilacqua, R., Schiavon, O., Rodighiero, G. (1978):

The binding of 8-methoxypsoralen by human serum albumin.

Farm. Ed. Sci. 33, 667-675

Veronese, F. M., Schiavon, O., Bevilacqua, R., Rodighiero, G. (1979a):

Drug-protein interaction: 8-Methoxypsoralen as photosensitizer of enzymes and amino acids.

Z. Naturforsch. 34c, 392-396

Veronese, F. M., Bevilacqua, R., Schiavon, O., Rodighiero, G. (1979b):

Drug-protein interaction: Plasma protein binding of furocoumarins.

Farm. Ed. Sci. 34, 716-726

Waksvik, H., Brøgger, A., Stene, J. (1977):

Psoralen/UVA treatment and chromosomes I. Aberrations and sister chromatid exchange in human lymphocytes in vitro and synergism with caffeine.

Hum. Genet. 38, 195-208

Weber, G. (1978):

Photochemotherapie.

Thieme, Stuttgart

Wolff, S. (1977):

Sister chromatid exchange.

Ann. Rev. Genet. 11, 183-201

Wolff, S., Carrano, A. V. (1979):

Report of the workshop on the utility of sister-chromatid exchange.

Mutat. Res. 64, 53-56

Wolff-Schreiner, E. C., Carter, D. M., Schwarzacher, H. G.,

Wolff, K. (1977):

Sister chromatid exchanges in photochemotherapy.

J. Invest. Dermatol. 69, 387-391

Wollenzien, P. L., Youvan, D. C., Hearst, J. E. (1978):

Structure of psoralen-crosslinked ribosomal RNA from *Drosophila melanogaster*.

Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 75, 1642

Yoshikawa, K., Mori, N., Sakakibaram S., Mizuno, N.,

Song, P.-S. (1979):

Photo-conjugation of 8-methoxypsoralen with proteins.

Photochem. Photobiol. 29, 1127-1133

Danken möchte ich an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. C. G. Arnold für seine fördernde Unterstützung und das mir stets entgegengebrachte Verständnis, insbesondere Herrn Dr. O. Schimmer für wertvolle Anregungen und Hilfen bei der Durchführung der Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft, Herrn Prof. Dr. E. Gebhart für seine engagierte Einführung in die Lymphocytentechnik, die mir zur Verfügung gestellten Arbeitsmöglichkeiten in seinem Labor sowie für wertvolle Diskussionen, und Herrn Prof. Dr. K. M. Hartmann für die Durchführung der Messungen der Bestrahlungsstärken und für seine stets bereitwillige Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Lebenslauf

Gudrun A b e l , geb. Hauber

- 1951 am 03. März in Weissenburg in Bayern als Tochter des Lehrers Fritz Hauber und seiner Ehefrau Ruth, geb. Lehner, geboren.
- 1957 - 1961 Besuch der Volksschule in Elbersroth bzw. in Feucht b. Nbg.
- 1961 - 1966 am Willibald-Gluck-Gymnasium Neumarkt/Opf.
- 1966 - 1970 am Theresien-Gymnasium Ansbach
- 20.06. 1970 Reifeprüfung
- 1970 - 1971 Studium an der Pädagogischen Hochschule Eichstätt
- 1971 - 1977 Studium der Mathematik und Biologie an der Universität Erlangen-Nürnberg
- Juni 1977 1. Staatsexamen für das Lehramt an Gymnasien in Mathematik und Biologie
- August 1979 Diplomprüfung in Biologie
- seit 1977 zunächst als DFG-Mitarbeiterin, seit 1.9.1979 als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Botanik und Pharmazeutische Biologie der Universität Erlangen-Nürnberg, Anfertigung einer Dissertation.
- seit 1976 verheiratet.

